

10/552485

JCO9 Rec'd PCT/PTO 06 OCT 2005

APPLICATION AS FILED

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP2005/013453

INTERNATIONAL FILING DATE: July 22, 2005

**Entitled: "Lrp/Corin DOPAMINERGIC NEURON
PROGENITOR CELL MARKERS"**

Attorney Docket No.: 082368-006500US

Best Available Copy

明 細 書

Lrp4/Corinドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカー

技術分野

- [0001] 本発明は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を検出および選択するためのポリヌクレオチドプローブ及び抗体、並びに、それらを用いたドーパミン産生ニューロン前駆細胞の検出および選択方法、並びに、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞等を用いたパーキンソン病等の神経変性疾患を治療するためのキットおよび治療方法に関する。

背景技術

- [0002] ドーパミン系は、哺乳動物の脳において重要な運動調節、ホルモン分泌調節、情動調節等に関与する非常に重要な系である。従って、ドーパミン作動性神経伝達における異常は、様々な神経系の障害を引き起こす。例えば、パーキンソン病は、中脳黒質のドーパミン産生ニューロンの特異的な脱落が原因で起こる錐体外路系の神経変性疾患である(HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE第2巻 第23版, Isselbacher et al.編, McGraw-Hill Inc., NY (1994) pp.2275-7)。パーキンソン病の治療法としては、産生されるドーパミン量の低下を補うためにL-DOPA(3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン)を経口投与する方法が主に採られているが、効果の持続性が良くないことが知られている。
- [0003] パーキンソン病治療において、最近では失われたドーパミン産生ニューロンを補うために、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む6～9週齢の中絶胎児の中脳腹側領域を移植する治療法も試みられている(特許文献1;非特許文献1～6)。しかし、現在のところ、この方法では細胞の供給面、倫理面(Rosenstain (1995) Exp. Neurol. 33: 106; Turner et al. (1993) Neurosurg. 33: 1031-7)で問題があると共に、感染汚染の危険性、免疫学的な移植片拒絶(Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80; Widner and Brudin (1988) Brain Res. Rev. 13: 287-324)、胎児組織が糖分解よりも脂質代謝に主に依存しているための生存率の低さ(Rosenstein (1995) Exp. Neuro. 1. 33: 106)等の様々な面で問題が指摘されている。

- [0004] 倫理面や供給不足の問題を解決するために、例えば、ブタ由来の皮質、線条、及び中脳細胞を用いる方法等も提案されている(例えば、特許文献2～4参照)。これらの方法においては、拒絶反応を抑制するため、細胞表面上の抗原(MHCクラスI抗原)を改変するという煩雑な操作が必要とされる。移植片拒絶を解消する方法としては、例えば、セルトリー細胞を同時に移植することにより、局在的に免疫抑制する方法も提案されている(特許文献5～6、及び非特許文献7)。MHCがマッチする血縁者、他人の骨髄、骨髄バンク、及び臍帯血バンク等から移植細胞を得ることも可能であるが、患者自身の細胞を用いることができれば、余計な操作や手間なしに拒絶反応の問題も解決することができる。
- [0005] そこで、中絶胎児由来の細胞に代えて、胚性幹細胞(ES細胞)、骨髄間質細胞などの非神経系細胞からのin vitroにおけるドーパミン産生ニューロンの分化系の移植材料としての利用が有望視されている。実際、ラットパーキンソン病モデルの病変線条へのES細胞移植により機能的なドーパミン産生ニューロンが形成されたとの報告もある(非特許文献8)。将来的にはES細胞若しくは患者本人の持つ神経幹細胞からの再生治療の重要性が増してくるものと思われる。
- [0006] 神経組織の損傷の治療においては脳機能の再構築が必要となり、周囲の細胞と適切なリンクを形成する(ネットワーク形成)ために成熟した細胞ではなくニューロンへとin vivoにおいて分化し得る細胞を移植する必要がある。ニューロン前駆細胞の移植において上述した供給面以外で問題となるのは、該前駆細胞が不均一な細胞集団へと分化する可能性がある点である。例えば、パーキンソン病の治療においては、カテコールアミン含有ニューロンの中でもドーパミン産生ニューロンを選択的に移植することが必要である。これまで、パーキンソン病の治療に用いることが提案されている移植細胞としては、例えば、線条体(非特許文献3及び9)、ヒト胎児神経由来の不死化セルライン(特許文献7～9)、NT2Z細胞の有糸分裂後ヒトニューロン(特許文献10)、ニューロン始原細胞(特許文献11)、ドーパミン等のカテコールアミンを産生するように外来遺伝子によりトランスフェクトされた細胞、骨髄ストローマ細胞(特許文献12～13)、遺伝子改変されたES細胞(非特許文献8)等が挙げられる。その他、胎児中脳組織由来の神経前駆細胞をFGF-8及びShhに接触させることにより形成されたドーパミン

産生ニューロン(特許文献14)、及びNT2神経細胞をレチノイン酸で処理することによりチロシン水酸化酵素を発現するようになった細胞(特許文献15)を用いることも提案されている。しかしながら、いずれも、ドーパミン産生ニューロンまたはドーパミン産生ニューロンへと分化する細胞のみを含むものではない。

[0007] 未分化な細胞集団からドーパミン産生ニューロンを選択的に濃縮・分離する方法としては、ドーパミン産生ニューロンで発現するチロシンハイドロキシラーゼ(以下、「TH」と称する場合がある)等の遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を細胞集団の各細胞に導入し、蛍光を発する細胞を分離することにより、ドーパミン産生ニューロンを生きたまま可視化して濃縮・分離、または同定する方法(特許文献16)が提案されている。この方法は、外来遺伝子の導入という煩雑な工程を不可欠とするものであり、さらに、遺伝子治療に用いることを目的とする場合、レポーター遺伝子の存在は毒性、免疫原性の面からも問題である。

[0008] 特許文献1:米国特許第5690927号
 特許文献2:特表平10-508487号公報
 特許文献3:特表平10-508488号公報
 特許文献4:特表平10-509034号公報
 特許文献5:特表平11-509170号公報
 特許文献6:特表平11-501818号公報
 特許文献7:特表平8-509215号公報
 特許文献8:特表平11-506930号公報
 特許文献9:特表2002-522070号公報
 特許文献10:特表平9-5050554号公報
 特許文献11:特表平11-509729号公報
 特許文献12:特表2002-504503号公報
 特許文献13:特表2002-513545号公報
 特許文献14:米国特許第6277820号
 特許文献15:国際公開第00/06700号

特許文献16:特開2002-51775号公報

非特許文献1:Spencer et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8

非特許文献2:Freed et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1549-55

非特許文献3:Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63

非特許文献4:Kordower et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332: 1118-24

非特許文献5:Defer et al. (1996) Brain 119: 41-50

非特許文献6:Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80

非特許文献7:Selawry and Cameron (1993) Cell Transplant 2: 123-9

非特許文献8:Kim et al (2002) Nature 418: 50-56

非特許文献9:Lindvall et al. (1989) Arch. Neurol. 46: 615-31

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] 現時点でのパーキンソン病移植治療における大きな問題の一つは、中絶胎児の中脳腹側領域、及び、in vitroで分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞のいずれもが多種の細胞の混合物である点である。神経回路形成における安全性を考えると、目的の細胞種のみを分離してから用いるのが望ましい。また、腫瘍形成の危険性を考慮すれば、分裂停止後の神経細胞を分離してから使用することが良いと考えられる。さらに、細胞の移植先の脳内での生存、及び正しくネットワーク形成する能力を考えると、より早期のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分離することにより治療効果を増大させ得ると期待される。

課題を解決するための手段

- [0010] そこで、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに2つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法(N-RDA;representational difference analysis法;RDA(Listsyn NA (1995) Trends Genet. 11:303-7)の改良(「DNA断片の量の均一化方法及びサブトラクション法」(WO2002/103007パンフレット))により同定した。その結果、本発明者らは、Lrp4/Corinの単離に成功した。Lrp4は、II型膜貫通蛋白質をコードしていた(図1)。

[0011] Lrp4 mRNAは、中脳では腹側中心部に特異的に発現し、その発現領域は、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞の存在する領域と一致する。さらに、Lrp4とドーパミン産生ニューロンのマーカーであるTHの発現と比較すると、両者のシグナルは背腹方向の位置は一致するものの、重ならない(図4及び5)。これにより、細胞分裂を停止し、神経管外層に移動した該前駆細胞ではLrp4 mRNAは発現していないことが示された。従って、Lrp4 mRNAを指標とすることにより、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を特異的に検出および選択することができる。

[0012] そこで、本発明は、Lrp4 mRNAを特異的に検出できるドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ、及び、該プローブを利用したドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法を提供するものである。さらに、本発明は、このようなヌクレオチドプローブを用いて選択された分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞(以下、単に「ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞」と称する場合がある)、並びに、該増殖前駆細胞を利用した、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞特異的遺伝子及び該前駆細胞からのドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該前駆細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に関する。また、本発明のヌクレオチドプローブを用いて選択された該増殖前駆細胞を培養し、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むドーパミン産生ニューロン系列の細胞を得ることもできる。ここで、ドーパミン産生ニューロン系列の細胞とは、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞及び/またはドーパミン産生ニューロンをいう。ドーパミン産生ニューロン系列の細胞もまた、ドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該前駆細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に利用することができる。よって、本発明は、本発明のヌクレオチドプローブを用いて選択されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を培養しドーパミン産生ニューロン系列の細胞を得る方法、このようにして得られた細胞、該細胞を用いたドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に関する。

[0013] さらに、抗Lrp4抗体を作製し、Lrp4蛋白質の発現について調べた。まず、組織内での発現について確認したところ(図8)、Lrp4 mRNAと同様に発現していることが確認された。この実験では、TH発現領域でもLrp4蛋白質のシグナルが検出されたが、増殖前駆細胞は神経管最外層に向けて突起を伸展しているため、このシグナルが突起上の蛋白質を検出した結果であるのか、またはTH発現細胞もLrp4蛋白質を発現しているのかを区別することができなかった。次に、抗Lrp4抗体を用い、Lrp4蛋白質が細胞表面に発現しているか否かをフローサイトメトリーにより解析した。サンプルには、Lrp4 mRNAの発現が確認された細胞である、*in vitro*においてES細胞をドーパミン産生ニューロン前駆細胞に分化誘導(SDIA法)させた細胞を用いた。その結果、当該細胞においてLrp4蛋白質が確かに細胞表面に発現していることが確認された(図9)。このような細胞表面に発現している蛋白質を分離マーカーとして利用すれば、細胞を生きた状態で選択することができるため、特に望ましい(図15参照)。また、5-stage法により*in vitro*においてES細胞をドーパミン産生ニューロン前駆細胞に分化誘導させ、RT-PCRおよび抗Lrp4モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによりLrp4の発現を確認した。その結果、5-stage法により分化されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞においても、Lrp4が発現していることが明らかとなった(図17A,B)。

[0014] 次に、分化誘導(SDIA法)させた細胞及びマウス胎児中脳腹側細胞より、抗Lrp4抗体を用いてセルソーターによるLrp4陽性細胞の分離を行った。分離された細胞について、RT-PCR法による遺伝子発現の解析を行ったところ、ニューロン増殖前駆細胞マーカーであるNestinの発現が認められたが、さらに分裂停止後のニューロンマーカーであるMAP2を発現する細胞も含まれることが明らかとなった(図10)。また、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーであるNurr1及びTHが、Lrp4陽性細胞集団において陰性細胞集団と比べて高レベルに発現されていた。従って、Lrp4蛋白質を指標として抗体を用いて細胞の選択を行った場合、Lrp4 mRNAを指標とする場合と異なり、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むドーパミン産生ニューロン前駆細胞を単離することができる。以下、本明細書において、「ドーパミン産生ニューロン前駆細胞」とは、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞および分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞をいう。また、SDIA法を用いて*in vit*

roでES細胞より分化誘導した細胞から抗Lrp4抗体を用いて分離した細胞について、ES細胞に特異的に発現するErasおよびNanogの発現解析を行った。その結果、Lrp4陽性細胞では発現が認められず、Lrp4陰性細胞では双方の遺伝子の発現が確認された(図18)。従って、抗Lrp4抗体を用いて細胞の選択を行うことにより、分化誘導を行った後も未分化であるES細胞を選択・除去することが可能となる。さらに、5-stage法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群から、Lrp4陽性細胞を分離した。次に、分離したLrp4陽性細胞をin vitroで培養した結果、TH蛋白質陽性のドーパミン産生ニューロンが誘導された(図17C)。このことより、5-stage法によって誘導されたLrp4陽性細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞であり、in vitroで成熟可能であることが明らかとなった。

[0015] よって、本発明は、Lrp4蛋白質を特異的に検出する抗体、及び、該抗体を利用したドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法を提供するものである。さらに、本発明は、このような抗体を用いて選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞、並びに、該前駆細胞を利用した、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び該前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該前駆細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に関する。また、本発明の抗体を用いて選択された該前駆細胞を培養し、その他の分化段階のドーパミン産生ニューロン系列の細胞を得ることもできる。このような細胞もまた、ドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該前駆細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法に利用することができる。よって、本発明は、本発明の抗体を用いて選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を培養しドーパミン産生ニューロン系列の細胞を得る方法、このようにして得られた細胞、該細胞を用いたドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法、及び該細胞の分化または増殖を誘導する化合物の成熟を指標としたスクリーニング方法にも関する。

[0016] さらに本発明者らは、抗Lrp4モノクローナル抗体を用いて分離したLrp4発現細胞を、パーキンソン病モデルマウス線状体に移植した。その結果、移植したマウスの線状

体内にEGFP陽性細胞が認められたことから(表1)、移植したLrp4タンパク質陽性細胞は、パーキンソン病モデルマウスの線状体において、生着しているものと考えられる。また、生着したほとんどの細胞は、成熟したニューロンのマーカーであるMAP2陽性であり、EGFP陽性の軸索が線状体内に長く伸展している様子も認められた(表1および図16)。移植したLrp4タンパク質陽性細胞が神経前駆細胞であったのに対し、生着したほとんどの細胞が成熟した神経細胞へと分化および成熟したこと、これら生着した細胞の約20 %はTH陽性であったことから、移植したLrp4タンパク質陽性細胞の少なくとも一部は、ドーパミン産生ニューロンへと分化したことが強く示唆された。したがって、本発明により分離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、脳内に移植することによってドーパミン産生ニューロンへの分化が可能であり、パーキンソン病の治療に有効であると考えられる。すなわち、本発明は、本発明により分離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む、神経変性疾患、好ましくはパーキンソン病を治療するためのキット、および、該ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を患者の脳内に移植することを特徴とする、神経変性疾患、好ましくはパーキンソン病の治療方法にも関する。

発明の効果

[0017] これまでに、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞で特異的に発現する膜蛋白質をコードする遺伝子は報告されていない。細胞膜表面に発現するLrp4蛋白質に対する抗体は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離に非常に効果的であると考えられる。例えば、抗Lrp4抗体を用いて、中脳腹側領域またはin vitroで分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む培養細胞から、Lrp4発現細胞を分離することで、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることができる(図15)。また、二つの異なる分化方法(SDIA法または5-stage法)により誘導されたいずれのドーパミン産生ニューロン前駆細胞においてもLrp4の発現が確認されたことから、Lrp4は、細胞の由来を問わず、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーとして有用である。さらに、Lrp4陽性細胞にはES細胞に特異的に発現するErasおよびNanogの発現が確認されないことから、Lrp4の発現を指標として、未分化のES細胞を選別することが出来る。

[0018] さらに、本発明において、分離したドーパミン産生ニューロン前駆細胞をそのまま、またはin vitroで増殖させた後に移植することも可能である。本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、脳内の最適な領域で分化成熟していく可能性やin vivoでさらに増殖する可能性もあり、長期的な治療効果が期待できる。また、Lrp4発現細胞をin vitroで分化、成熟させた後に移植を行えば、in vivoで何らかの理由でドーパミン産生ニューロンへの分化が行われない場合にも、治療効果が期待できる。腫瘍化等の危険性を考慮すれば、in vitroで増殖させたLrp4発現細胞を分化誘導した後に、65B13 (WO2004/038018パンフレット) 等の分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーを用いて分離した細胞を移植すれば、より高い安全性が期待できる。いずれの方法でも、Lrp4発現細胞を分離して移植治療に用いることで、目的の細胞種のみを分離しているので安全性が高く、また、最も初期のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を用いることができるため、生存率やネットワーク形成能等の面でも高い治療効果が期待される。分離直後の初期の該前駆細胞で最高の治療効果が得られない場合があったとしても、本発明のマーカーにより分離される該前駆細胞はin vitroで培養する等して成熟させることもできるため、最適な分化段階の材料を調製することを可能にするものである(図6)。

[0019] 一方、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、ドーパミン産生ニューロンに特異的な遺伝子の単離等、パーキンソン病治療のターゲット探索にも有効である。特に、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞は、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の研究や、成熟を指標にしたスクリーニング系だけでなく、該前駆細胞をin vitroまたはin vivoで増殖させる薬剤のスクリーニング、及び、in vivoで該前駆細胞から分化を誘導する薬剤(in vivoでの再生治療薬剤)のスクリーニング等にも有用である。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]Lrp4の構造を模式的に示す図である。TM:膜貫通ドメイン、FRI:frizzledドメイン、LDLa:LDLレセプタードメイン、SR:スカベンジャーレセプタードメイン、Protease:セリンプロテアーゼドメイン。

[図2]Lrp4及びShhのmRNAのE12.5マウス後脳腹側及び脊髄における発現をin situ ハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

[図3]Lrp4、Shh、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、及びNCAMのmRNAのE12.5マウス中脳腹側における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

[図4]Lrp4の中脳における発現パターンを模式的に示す図、並びに、Lrp4、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、Sim-1及びNCAMのmRNAのE12.5マウス中脳腹側における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。VZ: ventricular zone、ML: mantle layer。

[図5]Lrp4のmRNAのE12.5マウス中枢神経系における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。A:矢状面; B:Aの枠内部分の拡大写真; C:Aの赤線位置での断面。D:Lrp4、Shh及びチロシンヒドロキシラーゼ(TH)のmRNAのE12.5マウス中脳腹側における発現を示す。

[図6]ドーパミン産生ニューロンの発生から成熟までの間におけるLrp4、NCAM、TH及びDATのmRNAの発現時期を模式的に示す図である。

[図7]上は、SDIA法によるES細胞からのドーパミン産生ニューロンへの分化誘導を模式的に示す図及び写真である。下の写真は、SDIA法によりES細胞よりドーパミン産生ニューロンを分化誘導し、時間を追ってLrp4 mRNAの発現をRT-PCR法で調べた結果を示す。

[図8]E12.5マウス中脳におけるLrp4蛋白質の発現を示す写真である。

[図9]SDIA分化細胞におけるLrp4蛋白質の細胞表面での発現を、抗Lrp4抗体を用いてフローサイトメトリー解析した結果を示す図である。

[図10]Lrp4陽性細胞における、各種ドーパミン産生ニューロンマーカーの発現を分析したRT-PCRの結果を示す写真である。

[図11]ドーパミン産生ニューロンの発生から成熟までの間におけるLrp4のmRNA及び蛋白質、並びに、TH mRNAの発現時期を模式的に示す図である。Lrp4発現細胞の中にドーパミン産生ニューロンの増殖可能な前駆細胞と分裂停止した前駆細胞の両方が存在することを示す。

[図12]Lrp4陽性細胞の分化段階を調べた結果を示す写真である。

[図13]Lrp4陽性細胞をin vitroにおいて増殖させた結果を示す写真である。

[図14]Lrp4陽性細胞がドーパミン産生ニューロンへ分化することを示す写真である。

[図15]抗Lrp4抗体を用いたドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離及び活用法を示す模式図である。

[図16]移植されたLrp4陽性細胞のin vivoにおける分化を示す写真である。

[図17]5-stage法分化細胞におけるLrp4の発現とLrp4陽性細胞のドーパミン産生ニューロンへの分化を示す図および写真である。写真Cにおいて、矢印はTH蛋白質陽性のドーパミン産生ニューロンを示す。

[図18]Lrp4陽性細胞およびLrp4陰性細胞における、ES細胞特異的な遺伝子 (ERas およびNanog) の発現を分析したRT-PCRの結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

[0021] 以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

[0022] <マーカーポリヌクレオチドプローブ>

本発明のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブは、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択及び/または検出するためのマーカーおよび/または試薬として使用されるものである。該プローブとして使用されるポリヌクレオチドは、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞において検出される、配列番号:1または2の塩基配列に相補的な塩基配列を含むものである。配列番号:1はマウスLrp4 cDNAの塩基配列、そして配列番号:2はヒトLrp4 cDNAの塩基配列であり、それぞれGenBankに登録された配列である(マウス:Accession No. NM_016869;ヒト:Accession No. XM_035037)。

[0023] ここで、「マーカーポリヌクレオチドプローブ」とは、Lrp4の発現、特に転写されたmRNAを検出することができればよく、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指す。二本鎖cDNAも組織in situハイブリダイゼーションでプローブとして利用可能であることが知られており、本発明のマーカー

一にはそのような二本鎖cDNAも含まれる。組織中のRNAの検出において特に好ましいプローブとなるマーカーポリヌクレオチドプローブとしては、RNAプローブ(リボプローブ)を挙げることができる。また、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、 β -D-ガラクトシルキユエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、 β -D-マンノシルキユエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9- β -D-リボフラノシル-2-メチルリオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、ワイプトキソシン、プソイドウリジン、キユエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイプトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含んでもよい。

- [0024] さらに、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を含む。配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、配列番号:1または2に記載された塩基配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号:1または2記載の配列とは異なる塩基配列を含むものである。本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブはまた、配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において、膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に対して相補的な配列を含むものを包含する。配列番号:3または4記載のアミノ酸配列中、シグナル配列は存在せず、マウスLrp4(配列番号:3)では113-135 ア

ミノ酸残基、ヒトLrp4(配列番号:4)では46-68アミノ酸残基の部分が膜貫通領域を形成している。なお、配列番号:3及び4に記載の配列も各々GenBankに登録されている(ヒト:XP_035037、マウス:NP_058565)。

[0025] ここで、或る「塩基配列に対して相補的」とは、塩基配列が鋳型に対して完全に対になっている場合のみならず、そのうちの少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上(例えば、97%または99%)が対になっているものも含む。対になっているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中のAに対しT(RNAの場合はU)、TまたはUに対しA、Cに対しG、そしてGに対しCが対応して鎖が形成されていることを意味する。そして或るポリヌクレオチド同士の塩基配列レベルでの相同性は、BLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいた塩基配列についてのプログラムとして、BLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)が開発されており、マーカーポリヌクレオチドプローブ配列の相同性の決定に使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照することができる。

[0026] さらに、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブには、配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含むポリヌクレオチドが包含される。Lrp4については配列番号:1または2で示される塩基配列を有するものが公知であるが、そのアルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が存在する可能性があり、そのようなアイソフォームやアレリック変異体に相補的な配列を有するものも本発明のマーカーポリヌクレオチドとして利用することができる。このようなアイソフォーム及びアレリック変異体は、配列番号:1または2の塩基配列を含むポリヌクレオチドをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。cDNAライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd

ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを利用してもよい。

[0027] より具体的に、cDNAライブラリーの作製においては、まず、Lrp4を発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) *Biochemistry* 18: 5294-9)、AGPC法(Chomczynski and Sacchi (1987) *Anal. Biochem.* 162: 156-9)等の公知の手法により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit(Pharmacia)等を用いてmRNAを精製する。QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)のような、直接mRNAを調製するためのキットを利用してもよい。次に得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)のようなcDNA合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNAはPCRを利用した5'-RACE法(Frohman et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 2919-32)により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高いcDNAライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法(Maruyama and Sugano (1994) *Gene* 138: 171-4; Suzuki (1997) *Gene* 200: 149-56)等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られたcDNAは、適当なベクター中に組み込むことができる。

[0028] 本発明におけるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer(Amersham Life Science)を用いた方法として、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、最後に、1×SSC、0.1%SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えばExpresshyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37～55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分の洗浄を1回

行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジェントな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジェントな条件としては68℃とすることができる。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、Lrp4のアイソフォーム、アレリック変異体、及び対応する他種生物由来の遺伝子を得るための条件を設定することができる。

[0029] ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection9.47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995);条件については特にSection2.10)等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号:1または2の塩基を含む塩基配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは70%、さらに好ましくは80%、より一層好ましくは90%(例えば、95%以上、さらには99%)の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、上述の相同性の決定と同様にBLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。上述の塩基配列についてのプログラムBLASTNの他に、このアルゴリズムに基づいたアミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしてBLASTX(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、利用可能である。具体的な解析方法については先に挙げたように、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照することができる。

[0030] その他、遺伝子増幅技術(PCR)(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、Lrp4のアイソフォームやアレリック変異体等、Lrp4と類似した構造及び機能を有する遺伝子を、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから、配列番号:1または2に記載の塩基配列を基に設計したプライマーを利用

して得ることができる。

[0031] ポリヌクレオチドの塩基配列は、慣用の方法により配列決定して確認することができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)等による確認が可能である。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

[0032] また、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブには、上記(1) 配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列、(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な配列、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域部分を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な配列、及び(4)配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする配列の各塩基配列中の少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドが含まれる。このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4 mRNAの発現を検出するためのプローブ、増幅して検出を行うためのプライマーとして利用することができる。通常、プローブとして使用する場合には15～100、好ましくは15～35個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも15、好ましくは30個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3'末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5'末端側には制限酵素認識配列、タグ等を付加した形態に設計することができる。このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができる。

[0033] さらに、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブには、(1) 配列番号:1または2に記載の塩基配列、(2)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる塩基配列、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域部分を欠く配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる塩基配列、及び(4)配列番号:1または2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドからなる塩基配列、のいずれかに記載の塩基配列からなる第一のポリヌクレオチド

に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする第二のポリヌクレオチドが含まれる。第二のポリヌクレオチドは、好ましくは少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドがあげられる。

- [0034] 本発明のマーカージポリヌクレオチドプローブは、Lrp4を発現する細胞より上述のハイブリダイゼーション法、PCR法等により調製することができる。また、Lrp4の公知の配列情報に基づいて、本発明のマーカージポリヌクレオチドプローブは、化学合成により製造することもできる。特に組織中のRNAの検出に好ましいとされるリボプローブは、例えば、プラスミドベクターpSP64にクローニングしたLrp4遺伝子またはその一部を逆方向に挿入し、挿入した配列部分をランオフ転写することにより得ることができる。pSP64はSP6プロモーターを含むものであるが、その他、ファージT3、T7プロモーター及びRNAポリメラーゼを組合せてリボプローブを作成する方法も公知である。本発明のマーカージポリヌクレオチドプローブは、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を識別するための試薬として用いてもよく、上記の試薬においては、有効成分であるポリヌクレオチド以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、安定剤、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

[0035] <抗体>

本発明により、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を脳組織、または培養細胞より選択するために利用することができる、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカージ抗体(以下、「本発明の抗体」と称する場合がある)が提供される。Lrp4 mRNAと異なり、Lrp4ポリペプチドは、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞のみならず、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞にも発現していることから、該ポリペプチドに対する本発明の抗体を用いることにより、分裂停止前後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択および／または取得するために利用することができる。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFv)(Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol.113, Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp.269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and C

uello (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv等の抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は、必要に応じ、PEG等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質として製造することにより二次抗体を用いずに検出できるようにしてもよい。また、本発明の抗体は、ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るように改変してもよい。

[0036] 本発明の抗体は、(1)配列番号:1または2の塩基配列によりコードされるポリペプチド、(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド、(4)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、(5) 配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド、並びに(6)前記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチドのいずれかに対して特異的な抗体である。

また、本発明の抗体は、次の(1)～(4)のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドと結合する抗体であってもよい。(1)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列、(2)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列、(3)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加され、またはそれらの組合せにより変異されたアミノ酸配列、及び(4)配列番号:1または2に記載の塩基配列に相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドからなるアミノ酸配列。上記の一部配列からなるポリペプチドは、好ましくは少なくとも連続した6アミノ酸残基(例えば、8、10、12、または15アミノ酸残基以上)を有するポリペプチドがあげられる。

[0037] 配列番号:3で表されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置

換もしくは付加され、またはそれらの組合せにより変異されたアミノ酸配列としては、例えば、(i) 配列番号:3で表されるアミノ酸配列中の1～9個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号:3で表されるアミノ酸配列に1～9個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号:3で表されるアミノ酸配列中の1～9個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(iv) 上記(i)～(iii)の組合せにより変異されたアミノ酸配列があげられる。

- [0038] 配列番号:4で表されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加され、またはそれらの組合せにより変異されたアミノ酸配列としては、例えば、(i) 配列番号:4で表されるアミノ酸配列中の1～9個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号:4で表されるアミノ酸配列に1～9個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号:4で表されるアミノ酸配列中の1～9個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(iv) 上記(i)～(iii)の組合せにより変異されたアミノ酸配列があげられる。

ここで、アミノ酸の欠失とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が欠失した変異を意味し、欠失には、アミノ酸配列の端からアミノ酸残基が欠失したもの及びアミノ酸配列の途中のアミノ酸残基が欠失したものが含まれる。

ここで、アミノ酸の付加とは、配列中にアミノ酸残基の一つ以上が付加された変異を意味し、付加には、アミノ酸配列の端にアミノ酸残基が付加されたもの及びアミノ酸配列の途中にアミノ酸残基を付加されたものが含まれる。

ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換によりアミノ酸配列を改変する場合、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と

似た性質のアミノ酸をコードするように配列を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸(Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸(Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, His, Lys)、中性アミノ酸(Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸(Ala, Gly)、分枝アミノ酸(Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸(Ser, Thr)、アミド型アミノ酸(Gln, Asn)、含硫アミノ酸(Cys, Met)、芳香族アミノ酸(His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸(His, Trp)、イミノ酸(Pro, 4Hyp)等に分類することができる。

従って、非極性アミノ酸同士、あるいは非荷電性アミノ酸同士で置換させることが好ましい。中でも、Ala、Val、Leu及びIleの間、Ser及びThrの間、Asp及びGluの間、Asn及びGlnの間、Lys及びArgの間、Phe及びTyrの間の置換は、タンパク質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数及び部位は特に制限ない。

[0039] 特に好ましい本発明の抗体として、実施例4において使用された2種の抗Lrp4抗体及びその断片を含む改変体を挙げることができる。該2種の抗体は、下記の各受託番号で国際寄託されている。

(1)寄託機関の名称・あて名

名称:独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

あて名:日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)

(2)受託日:2004年7月14日

(3)受託番号:FERM BP-10315及びFERM BP-10316

(日本国において国内寄託されたFERM P-20120及びFERM P-20121より移管)

[0040] 本発明の抗体は、Lrp4ポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発現する細胞を感作抗原として利用することにより製造することができる。また、Lrp4ポリペプチドの短い断片は、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合した形で免疫原として用いてもよい。また、Lrp4のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバント、完全(または不完全)フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強化するために用いてもよい。

- [0041] 本発明における「Lrp4ポリペプチド」は、ペプチド重合体であり、配列番号:3または4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を好ましい例として挙げるができる。Lrp4ポリペプチドを構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。さらに、Lrp4ポリペプチドには膜貫通領域部分を欠く蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融合蛋白質が含まれる。
- [0042] 本発明において、Lrp4ポリペプチドは、Lrp4ポリペプチドの抗原性を有すればよく、配列番号:3または4のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを包含する。1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である(Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。そして、このような配列番号:3または4のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有するLrp4の抗原性を維持したポリペプチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを公知の『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製し、適宜発現させることにより得ることができる。また、上記の部位特異的変異誘発の他にも、遺伝子を変異源で処理する方法及び遺伝子を選択的に開裂し、次に選択されたヌクレオチドを除去、付加または置換し、次いで連結することもできる。
- [0043] Lrp4ポリペプチド断片は、上記Lrp4ポリペプチドの一部と同一であり、好ましくは少なくとも連続した6アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片である。特に好ましい断片としては、アミノ末端、カルボキシル末端、膜貫通ドメインを欠失したポリペプチド断片を挙げるができる。 α ヘリックス

及び α ヘリックス形成領域、 α 両親媒性領域、 β シート及び β シート形成領域、 β 両親媒性領域、基質結合領域、高抗原指数領域、コイル及びコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、ターン及びターン形成領域、並びに表面形成領域を含む断片がLrp4のポリペプチド断片に含まれる。本発明におけるLrp4のポリペプチド断片は、Lrp4ポリペプチドの抗原性さえ有すればどのような断片であってもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性／親水性を解析する方法(Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22)、二次構造を解析する方法(Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem 47: 251-76)により推定し、さらにコンピュータープログラム(Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認するPEPSCAN法(特表昭60-500684号公報)等により確認することができる。

[0044] Lrp4ポリペプチド、及びポリペプチド断片は、Lrp4を発現する細胞・組織等を原料として、その物理的性質等に基づいて単離することができる。また、公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することもできる。例えば、Lrp4ポリペプチドをin vitroで製造する場合、in vitroトランスレーション(Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44)等の方法に従って、細胞を含まない試験管内の系でポリペプチドを製造することができる。それに対して、細胞を用いてポリペプチドを製造する場合、まず所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを適当なベクターに組み込み、適当な宿主細胞を選択し該ベクターによる形質転換を行い、形質転換された細胞を培養することにより所望のポリペプチドを得ることができる。

[0045] 適当なベクターとして、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターを挙げることができる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。ベクターは、導入された宿主細胞内で所望のポリヌクレオチドが発現されるように制御配列を有し、ポリヌクレオチドは該制御配列下に結合される。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソーム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリAシグナル、スプライシング及びポリアダニル化

シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。ベクターは、選択可能なマーカーを含んでいてもよい。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。このようなシグナルペプチドとして、異種蛋白質由来のシグナルペプチドを利用することができる。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAGまたはTGA)の挿入を行ってもよい。

- [0046] in vitroにおけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBEST(Promega)を例示することができる。また、原核細胞宿主における発現に適した種々のベクターが公知であり(『微生物学基礎講座8 遺伝子工学』(共立出版)等参照)、原核細胞を宿主として選択した場合、当業者であれば選択した宿主に適したベクター、ベクターの宿主への導入方法を適宜選ぶことができる。その他、酵母等の真菌類、高等植物、昆虫、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類、種々の培養系細胞(COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞)、ミエローマ、Vero、Namalwa、Namalwa KJM-1、HBT5637(特開昭63-299号公報)等)もLrp4ポリペプチド及びその抗原性断片を発現させる宿主として利用することができ、各細胞に適したベクター系、ベクターの宿主細胞への導入手法も公知である。さらに、動物の生体内 (Susumu (1985) Nature 315: 592-4; Lubon (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4: 1-54等参照)、及び植物体において外来蛋白質を発現させる方法も公知でありLrp4ポリヌクレオチドを発現させるために利用することができる。

- [0047] ベクターへのDNAの挿入は、制限酵素サイトを利用したリガーゼ反応により行うことができる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。また必要に応じ、使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高い塩基配列を選択し、Lrp4ポリペプチドコード発現ベクターを設計することができる(Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: r43-74)。Lrp4ポリペプチドを産生する宿主は、Lrp4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細

胞内に含むものであるが、該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になればよく、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

ベクターの宿主細胞への導入形質(転換(形質移入))は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌(*E. coli*, *Bacillus subtilis*等)の場合は、例えばCohenらの方法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 2110(1972))、プロトプラスト法(*Mol. Gen. Genet.*, 168, 111(1979))やコンピテント法(*J. Mol. Biol.*, 56, 209(1971))によって、*Saccharomyces cerevisiae*の場合は、例えばHinnenらの方法(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1927(1978))やリチウム法(*J. Bacteriol.*, 153, 163(1983))によって、植物細胞の場合は、例えばリーフディスク法(*Science*, 227, 129 (1985))、エレクトロポレーション法(*Nature*, 319, 791 (1986))、アグロバクテリウム法(Horsch et al., *Science*, 227, 129(1985)、Hiei et al., *Plant J.*, 6, 271-282(1994))によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法(*Virology*, 52, 456(1973))、昆虫細胞の場合は、例えばSummersらの方法(*Mol. Cell. Biol.*, 3, 2156-2165(1983))によってそれぞれ形質転換することができる。

- [0048] 宿主細胞の培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には、DMEM(*Virology* 8: 396 (1959)、MEM(*Science* 122: 501 (1952))、RPMI1640(*J. Am. Med. Assoc.* 199: 519 (1967))、199(*Proc. Soc. Biol. Med.* 73: 1 (1950))、IMDM等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清を添加し、pH約6~8、30~40℃において15~200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

- [0049] 通常、遺伝子組換え技術により製造されたLrp4ポリペプチドは、まず、ポリペプチドが細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物の回収を行うことができる。そして、蛋白質の精製方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、溶媒沈澱、溶

媒抽出、硫酸またはエタノール沈澱等を適宜組合せることにより所望のポリペプチドを精製することができる。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。また、例えば、GSTとの融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。Lrp4ポリペプチドを融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa等を使用して不要な部分を切断することもできる。

[0050] また、天然由来のポリペプチドを精製して取得してもよい。例えば、Lrp4ポリペプチドに対する抗体を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。さらに、精製したポリペプチドを必要に応じキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシルエンドペプチダーゼ等の酵素を用いて修飾することも可能である。一方、Lrp4のポリペプチド断片は、上述のLrp4ポリペプチドと同じような合成及び遺伝子工学的な手法に加えて、ペプチダーゼのような適当な酵素を用いてLrp4ポリペプチドを切断して製造することもできる。

[0051] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択するためのポリクローナル抗体は、例えば、上述のようにして精製されたLrp4のポリペプチドまたはその断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得ることができる。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原をPhosphate-Buffered Saline(PBS)または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じてアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバン

トに混合した感作抗原を4～21日毎に数回投与する。抗体の産生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

[0052] また、モノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞とポリエチレングリコール(PEG)等を用いて融合してハイブリドーマを作成することができる。細胞の融合は、Milsteinの方法(Galfre and Milstein (1981) *Methods Enzymol.* 73: 3-46)に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞を挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液(HAT培養液)で培養して選択することができる。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポリペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を産生するクローンを選択することができる。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得ることができる。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照することもできる。本発明のハイブリドーマとしては、好ましくはFERM BP-10315またはFERM BP-10316を挙げることができる。

[0053] ハイブリドーマは、その他、最初にEBウイルスに感染させたヒトリンパ球をin vitroで免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U266等)と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭63-17688号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(WO92/03918; WO93-02227; WO94/02602; WO94/25585; WO96/33735; WO96/34096; Mendez et al. (1997) *Nat. Genet.* 15: 146-56等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げ

られる。

- [0054] また、本発明の抗体は、遺伝子組換え技術により製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, MacMillan Publishers LTD., UK参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を産生させることができる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-9; Presta (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-6; *Methods Enzymol.* 203: 99-121 (1991))。
- [0055] 抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造することができる。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al., (1994) *J. Immunol.* 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) *Methods Enzymol.* 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) *Methods Enzymol.* 178: 497-515; Lamoyi (1986) *Methods Enzymol.* 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) *Trends Biotechnol.* 9: 132-7参照)。
- [0056] 多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) *Behring Inst. Mitt.* 78: 118-32)、(2)異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを融合する方法(Millstein and Cuello (1983) *Nature* 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髄腫細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクションした後、二特異性の二価部分を単離する方法(Zimmermann (1986) *Rev. Physio. Biochem. Pharmacol.* 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) *Int. J. Cancer* 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構

成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる(Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; WO93/11161参照)。

[0057] 抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテインA及びGを用いて行うほか、抗体以外のポリペプチドの製造の場合と同様に上記した蛋白質精製技術によっても行うことができる(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテインAを利用する場合、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F.(Pharmacia)等のプロテインAカラムを使用することができる。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等により決定することができる。

[0058] 抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA等により測定することができる。例えば、ELISA法により測定する場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いでLrp4ポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産生細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次抗体がアルカリホスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore(Pharmacia)等の市販の系を使用することもできる。

本発明は、抗Lrp4抗体を有効成分とする、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を識別するための試薬に関する。上記の試薬においては、有効成分である本発明の抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤(BSAやゼラチンなど)、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

[0059] <ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択方法等>

本発明により、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択的に均一な集団として選択する方法が提供された。ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞は、本発明

のマーカールポリヌクレオチドプローブを用いることにより選択することができる。また、本発明により、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択的に均一な集団として選択される方法が提供された。ドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、本発明の抗体を用いて好適に選択することができる。このように本発明のポリヌクレオチドプローブまたは抗体を用いることにより、最終的にドーパミンを産生するニューロンへと分化するドーパミン産生ニューロン系列の細胞が特異的に選択される。

[0060] ここで、「選択」という用語は、或る試料中のマーカールを発現する細胞の存在を検出すること、及び、存在を検出しさらに分離または単離することの両方を含むものである。本発明は、本発明のマーカールポリヌクレオチドプローブとドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含む細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法を提供するものである。該方法においては、マーカールポリヌクレオチドプローブを好ましくは放射性同位体または非放射性化合物で標識しておく。例えば、標識するための放射性同位体としては、 ^{35}S 、 ^3H 等を挙げることができる。放射標識したマーカールポリヌクレオチドプローブを用いた場合、エマルションオートラジオグラフィーにより銀粒子を検出することによりマーカールと結合するRNAを検出することができる。また、マーカールポリヌクレオチドプローブ標識のための非放射性同位体としては、ビオチン、ジゴキシゲニン等が例示される。ビオチン標識マーカールの検出は、例えば、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識したアビジンを用いて行うことができる。一方、ジゴキシゲニン標識マーカールの検出には、例えば、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識した抗ジゴキシゲニン抗体を使用することができる。酵素標識を使用する場合には、酵素の基質と共にインキュベートし、安定な色素をマーカール位置に沈着させることで検出を行うことができる。特に蛍光を利用した、in situハイブリッド形成法(FISH)が簡便であり、特に好ましいものである。

[0061] また、本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択するための抗体およびドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞試料とを接触させる工程を含む、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法が提供される。即ち、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むことが予測される細胞試料と本発明の抗体

とを接触させ、抗体に結合する細胞を選択することでドーパミン産生ニューロン前駆細胞を取得できる(図13参照)。細胞試料との接触前に、本発明の抗体を適当な担体に固定化して用いることも可能である。また、細胞試料と本発明の抗体とを接触させ、結合させた後、抗体のアフィニティーによる精製を行うことで、該抗体と結合した細胞を選択的に回収することもできる。例えば、本発明の抗体がビオチンと結合されている場合には、アビジンやストレプトアビジンを結合したプレートやカラムに対して添加することにより精製を行うことができる。その他、例えば、磁性粒子を抗体に結合し、該抗体及び抗体に結合したLrp4を細胞表面上に発現している細胞を、磁石を利用して回収することもできる。また、セルソーター、及び蛍光等により標識した抗Lrp4抗体を使用して、フローサイトメトリーによりLrp4を発現するドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することもできる。

このようにして得られたドーパミン産生ニューロン前駆細胞集団は、例えば、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、特に好ましくは70%以上のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含有する細胞集団である。

[0062] 本発明により、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を培養することにより、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択および／または製造する方法が提供される。また、本発明により、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞試料とを接触させ、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択し、前記選択された細胞を培養することにより、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択および／または製造する方法が提供される。

さらに、本発明により、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を培養し、さらに分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーを用いて選択および／またはスクリーニングすることにより、腫瘍化する危険性の低い移植治療に特に適した分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることもできる。分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーとしては、例えば、65B13、Nurr1、TH等を挙げることができる(WO2004/038018; Kawasaki et al. (2000) Neuron 28: 31-40; Wallen et al. (1

999) Exp. Cell Res. 253: 737-46)。例えば、本発明のマーカージポリヌクレオチドプローブまたは抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞試料とを接触させ、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択し、さらに必要に応じて培養したドーパミン産生ニューロン前駆細胞と65B13ポリペプチドに対する抗体とを接触させて65B13ポリペプチドを発現している細胞を選択することにより、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択および／または製造することができる。

[0063] 本発明により、本発明のマーカージポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を培養することにより、ドーパミン産生ニューロンを選択および／または製造する方法が提供される。また、本発明により、本発明のマーカージポリヌクレオチドプローブまたは抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞試料とを接触させ、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択し、前記選択された細胞を培養することにより、ドーパミン産生ニューロンを選択および／または製造する方法が提供される。

また、本発明により、本発明のマーカージポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を培養し、さらにドーパミン産生ニューロンマーカーを用いて選択および／またはスクリーニングすることにより、腫瘍化する危険性の低い移植治療に特に適したドーパミン産生ニューロンを得ることもできる。ドーパミン産生ニューロンマーカーとしては、例えば、DAT等を挙げることができる (Development. 2004. 131(5):1145-55.)。例えば、本発明のマーカージポリヌクレオチドプローブまたは抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞試料とを接触させ、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択し、さらに培養したドーパミン産生ニューロン前駆細胞と、DATに対する抗体とを接触させて、DATを発現している細胞を選択することにより、ドーパミン産生ニューロンを選択および／または製造することができる。

[0064] 本発明により、本発明の抗体を使用して選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を培養し若しくは培養無しで、さらに分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を除去することにより、培養増殖可能なドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択および／または製造する方法が提供される。また、本発明により、本発明の

抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞試料とを接触させ、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択し、前記選択された細胞を培養し若しくは培養無しで、さらに分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を除去することにより、培養増殖可能なドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択および／または製造する方法が提供される。

分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の除去は、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーを用いて選択および／または除去することにより、培養増殖可能なドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を得ることもできる。分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーとしては、例えば65B13、Nurr1、TH等を挙げることができる(WO2004/038018; Kawasaki et al. (2000) Neuron 28: 31-40; Wallen et al. (1999) Exp. Cell Res. 253: 737-46)。例えば、本発明の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞試料とを接触させ、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択し、さらに必要に応じて培養したドーパミン産生ニューロン前駆細胞と65B13ポリペプチドに対する抗体とを接触させて65B13ポリペプチドを発現していない細胞を選択することにより、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択および／または製造することができる。

[0065] Lrp4発現ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択及び／またはスクリーニングは、Lrp4に対するプロモーターを利用して行うこともできる(例えば、特開2002-51775号公報参照)。例えば、後述するLrp4の発現制御領域解析により得られるプロモーター部分に対し、GFP等の検出可能なマーカーをコードする遺伝子を連結した構築物を含むベクターを細胞に対してトランスフェクションすることができる。その他、Lrp4遺伝子座へマーカーをコードする遺伝子をノックインすることができる。どちらの場合にも、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的にマーカー遺伝子の発現が検出されることとなり、特異的な細胞の選択が可能となる。

[0066] ここで、使用する細胞試料は、好ましくは中脳腹側領域の細胞、またはin vitroで分化誘導されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む培養細胞である。in vitroにおけるドーパミン産生ニューロンの分化誘導は、公知のES細胞、骨髄間質細胞、神経由来の不老化セルライン(特表平8-509215号公報; 特表平11-506930号公報; 特

表2002-522070号公報)、ニューロン始原細胞(特表平11-509729号公報)等の細胞を出発材料として、公知の方法により行うことができる。通常、ドーパミン産生ニューロンは、脳のドーパミン産生ニューロン領域から得た組織を神経組織由来の支持細胞層と共培養することにより分化させることができる。さらに、線条体及び皮質等の通常非ドーパミン産生神経組織からドーパミン産生ニューロンを誘導する方法も知られている(特表平10-509319号公報)。また、低酸素条件下での培養により、より多くドーパミン産生ニューロンを含む細胞が得られるとの報告もある(特表2002-530068号公報)。また、5-stage法(Lee et. al. (2000) Nat.Biotech. 18: 675-679、mouse dopaminergic neuron differentiation kit (R&D Systems))によりES細胞(CCE)よりドーパミン産生ニューロンへの分化誘導を行ってもよい。本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択に用いる細胞試料は、これらを含む如何なる方法により分離または培養された細胞群であつてもよい。

[0067] また、本発明の抗体を固定する担体は、細胞に対して無害なものであることが好ましい。担体は、例えば、合成または天然の有機高分子化合物、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭等の無機材料、及びこれらの表面に多糖類、合成高分子等をコーティングしたものがあげられる。担体の形状は、特に制限はなく、膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状等が挙げられ、その厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、大きさを種々変えることにより接触面積を制御することができる。

[0068] <ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む神経変性疾患を治療するためのキットおよびドーパミン産生ニューロン前駆細胞を用いた神経変性疾患の治療方法>
ポリヌクレオチドプローブを用いLrp4 mRNAの発現を指標として獲得された細胞は、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞であり、抗体を用いLrp4ポリペプチドの発現を指標として獲得された細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞であり、mRNAまたはポリペプチドのどちらを指標とした場合であっても、ドーパミン産生ニューロン系列の細胞集団が得られる。本発明の方法により取得された前駆細胞は、従来の雑多な細胞集団または外来遺伝子を導入したドーパミン産生ニューロンと比べて、安全性、生存率、ネットワーク形成能の面で姿勢反射、運動、及び報酬関連行動(reward-

associated behaviors)に関わる疾患、特に、パーキンソン病等の神経変性疾患、精神分裂病、及び薬物嗜癖(Hynes et al. (1995) Cell 80: 95-101)の移植治療に好ましいものである。Lrp4の発現を指標として獲得された細胞は、そのまま、またはin vitroで増殖させた後に移植に使用することができる(図13)。このような細胞は、脳内の最適な場所で分化成熟していく可能性があることから治療効果が期待される。すなわち、本発明は、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択ならびに／または製造されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞および／もしくはドーパミン産生ニューロンを含む、神経変性疾患を治療するためのキット(以下、「本発明のキット」と称する場合がある)ならびに、該細胞を患者の脳内に移植することを特徴とする、神経変性疾患の治療方法をも提供する。さらに、神経変性疾患を治療するためのキットを製造するための本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択ならびに／または製造されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞および／もしくはドーパミン産生ニューロンの使用も提供する。本発明において神経変性疾患は、好ましくはパーキンソン病が挙げられる。本発明のキットは、細胞以外に薬学的に許容される担体を含んでいてもよい。担体としては、例えば、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液、血清、生体液、カルボキシメチルセルローズ液、細胞の足場となる固体(例えば、cytodex3 (Amersham Bioscience, 17-0485-01)等)、細胞外基質成分(例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、ヘパラン硫酸、プロテオグリカン、グリコサミノグリカン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン、エラスチンまたはこれら2種以上の組み合わせ等)またはゲル状の支持体などがあげられる。また、本発明のキットは、pH調製剤、緩衝剤、安定化剤、保存剤等を添加することができる。本発明のキットは、一回接種用でも複数回接種用でも良い。また、投与量は、接種されるヒトまたは動物の体重、年齢、投与方法などにより適宜選択することが可能である。

[0069] Lrp4の発現を指標として選択されるドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、in vivoにおいてさらに増殖する可能性があることから、より長期的な治療効果が期待される。さらに、Lrp4の発現を指標として選択されるドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、in

vitroにおいて培地等の条件を選択することにより適当な段階まで分化させることも可能であり、種々の神経移植治療の材料としても好ましいものである。例えば、前述したように、Lrp4の発現を指標として選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞について、さらに細胞分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカー(例えば、65B13、Nurr1、TH等)を指標とした選択を行うことにより、より移植の上では安全性の高い細胞を得ることもできる。本発明は、上記の前駆細胞をin vitroで培養し、分化増殖させる方法に関する。培養を行うドーパミン産生ニューロン前駆細胞は分裂停止後の前駆細胞であってもよい。

[0070] 本発明の方法により得られたドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、例えば、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ 個の細胞、好ましくは $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 個の細胞、より好ましくは $5 \sim 6 \times 10^4$ 個の細胞を移植することができる。第1の方法としては、細胞の懸濁液を脳に移植する定位脳固定術(stereotaxic surgery)が挙げられる。また、マイクロ手術(microsurgery)により細胞を移植しても良い。ニューロン組織の移植方法については、Backlund等(Backlund et al. (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73)、Lindvall等(Lindvall et al. (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68)、Madrazo等(Madrazo et al. (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4)の方法を参照することができる。

[0071] さらに、本発明の細胞は、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞特異的遺伝子及び増殖前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、パーキンソン病治療のターゲット探索、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、並びに成熟を指標としたスクリーニング等にも利用することができる。

[0072] <遺伝子発現レベルの比較>

本発明のポリヌクレオチドプローブまたは抗体を用いて得られるドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、該細胞において特異的に発現している遺伝子を単離する材料として使用することができる。さらに、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的に発現している遺伝子を調べ、単離することもできる。また、分化／誘導／増殖させた細胞と元の該前駆細胞とにおいて発現レベルに差違のある遺伝子を調べることによりドーパミン産生ニューロンの生体内における分化に必要とされる遺伝子を調べることもできる。このような遺伝子はドーパミ

ン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得るので、当該遺伝子を決定し、単離することは非常に有用である。

- [0073] 本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞と該前駆細胞から分化／誘導／増殖された細胞若しくはその他の細胞、または該分化／誘導／増殖された細胞とその他の細胞との間での遺伝子の発現レベルの比較は、慣用の細胞in situハイブリダイゼーション、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、RNAドットブロットハイブリダイゼーション、逆転写PCR、RNase保護アッセイ、DNAマイクロアレイハイブリダイゼーション、遺伝子発現の連続解析(SAGE; serial analysis of gene expression)(Velculescu et al. (1995) Science 270: 484-7)、差し引きハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)、代表差違分析(representation difference analysis; RDA)(Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7)等により行うことができる。
- [0074] 細胞in situハイブリダイゼーションでは、特定のRNA配列に特異的な標識プローブを用い細胞から調製した総RNAまたはpolyA⁺RNAに対してハイブリダイゼーションを行うことにより、個々の細胞におけるRNAのプロセッシング、輸送、細胞質への局在化が起こる場所等を調べることができる。また、RNAの大きさをゲル電気泳動等によりサイズ分画して決定することもできる。また、定量的な蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)及びデジタル画像顕微鏡を用いれば、RNA転写産物をin situで視覚的に捉えることも可能であり(Femino et al. (1998) Science 280: 585-90)、本発明において利用することができる。
- [0075] 遺伝子発現の解析で逆転写PCRを用いた場合、特定遺伝子の発現を大まかに定量することができる。本方法では、1つのRNA転写産物の種々のアイソフォームを検出及び解析することも可能である。逆転写PCRにおいてはまず、エキソン特異性プライマーを用いた逆転写PCRを行い、予想された産物以外の増幅産物が検出された場合、それらを解析することにより選択的スプライシングにより生じるmRNAアイソフォームを同定することが可能である。例えば、Pykett et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 559-64等に記載の方法を参照することができる。特に大まかな発現パターンを迅速に解析することが求められる場合、本発明のPCRを利用した本方法は、その速さ、感度の高さ、簡便さの点からも望ましいものである。

- [0076] DNAチップを使用することにより、遺伝子発現スクリーニングの能率を向上させることができる。ここで、DNAチップとは、ガラス等の担体表面上にオリゴヌクレオチドまたはDNAクローン等を高密度に固定した小型のアレイである。例えば、多重発現スクリーニングを行うためには、各目的遺伝子に対するcDNAクローンまたは該遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドをチップに対して固定化し、マイクロアレイを作製する。次に本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該前駆細胞より分化／誘導／増殖された細胞よりRNAを調製し、逆転写酵素処理を行い、cDNAを得る。次に、得られたcDNA試料を蛍光タグ等のタグにより標識し、マイクロアレイに対するハイブリダイゼーションを行う。その結果、総標識cDNA中、細胞内で活発に発現している遺伝子の割合が高くなり、あまり発現されていない遺伝子の割合は低くなる。即ち、標識cDNAとチップ上のcDNAクローンまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を表す蛍光シグナルの強度は、標識cDNA内での各配列の発現の度合いを示すこととなり、遺伝子発現の定量を可能成らしめる。
- [0077] また、縮重PCRプライマーを用いた逆転写PCRを行うmRNAディファレンシャルディスプレイにより、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該前駆細胞から分化／誘導／増殖された細胞について多数の遺伝子の発現を同時に解析することもできる。まず、特定のmRNAのpolyA尾部に3'末端の1または2つの塩基を変更した修飾オリゴdTプライマーを準備し、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞または該前駆細胞から分化／増殖された細胞、及び、発現を比較する対照細胞から単離した総RNAに対して逆転写酵素反応を行う(Liang et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 3269-75)。変更した塩基が「G」であれば、polyA尾部の直前にCを持つmRNAを選択的に増幅することができ、また「CA」であれば、TGを直前に持つmRNAを増幅することができる。次に、第2のプライマーとして、10塩基程度の長さの任意の配列を有するものを用意し、修飾オリゴdTプライマー及び第2のプライマーを使用してPCR増幅反応を行う。増幅産物を泳動距離の長いポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、サイズ分画する。このような方法により、本発明の細胞と対照細胞とで各細胞に特異的に発現しているmRNA由来のcDNAは、一方の試料を泳動した場合にのみ検出されるバンドとして検出することができる。この方法では、同定されていない遺伝子の

発現についても解析することができる。

[0078] SAGE分析は、多数の転写産物の発現を同時に検出することができ、また検出に特殊な装置を必要としない点で好ましい分析方法の一つである。まず、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞または該前駆細胞から分化／誘導／増殖された細胞よりpolyA⁺RNAを慣用の方法により抽出する。次に、ビオチン化オリゴdTプライマーを用い、前記RNAをcDNAに変換し、4塩基認識制限酵素(アンカー用酵素;AE)で処理する。これにより、AE処理断片はその3'末端にビオチン基を含んだ形となる。次に、AE処理断片をストレプトアビジンに結合させる、結合されたcDNAを2画分に分け、それぞれの画分を別々の2本鎖オリゴヌクレオチドアダプター(リンカー)A及びBに連結する。このリンカーは、(1)アンカー用酵素の作用で生じる突出部の配列と相補的な配列を有する1本鎖突出部、(2)タグ用酵素(tagging enzyme;TE)となるIIS型制限酵素(認識部位より20bp以下の離れた定位置の切断を行う)の5'塩基認識配列、及び(3)PCR用特異的プライマーを構成するのに十分な追加配列より構成される。ここで、リンカーを連結したcDNAをタグ用酵素で切断することにより、リンカー結合型の状態でcDNA配列部分のみが短鎖配列タグとなる。次に、リンカーの異なる2種類のプールを互いに連結し、リンカーA及びBに特異的プライマーを使用してPCR増幅する。その結果、増幅産物はリンカーA及びBに結合した2つの隣接配列タグ(ダイタグ;ditag)を含む多様な配列の混在物として得られる。そこで、増幅産物をアンカー用酵素により処理し、遊離したダイタグ部分を通常の連結反応により鎖状に連結し、クローニングを行う。クローニングにより得られたクローンの塩基配列を決定することにより、一定長の連続ダイタグの読み出しを得ることができる。このようにしてクローンの塩基配列を決定し、配列タグの情報が得られれば、それぞれのタグに該当するmRNAの存在を同定することができる。

[0079] 差し引きハイブリダイゼーションは、種々の組織または細胞間で発現の差違のある遺伝子のクローニングによく用いられる方法であるが、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該前駆細胞から分化／誘導／増殖された細胞において特異的に発現している遺伝子をクローニングするのにも使用することができる。まず、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞のうち試験する細胞のDNA試料を調製す

る(以下、テストDNAと呼ぶ)。次に、比較する細胞のDNA(以下、ドライバーDNAと呼ぶ)を調製する。テストDNAとドライバーDNAとを逆に用いることもできる。いずれにせよ、テストDNAに存在し、ドライバーDNAに存在しない遺伝子の存在が検出される。次に、調製したテストDNA及び大過剰量のドライバーDNAを混合し、変性させ一本鎖DNAとした後にアニーリングさせる。アニーリング条件を調節することにより、ドライバーDNA中には存在しない特異的な配列をテストDNA由来のDNAのみからなる二本鎖DNAとして単離することができる。より詳細な方法については、Swaroop et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1954及び Yasunaga et al. (1999) Nature Genet. 21: 363-9等を参照することができる。

- [0080] RDA法は、PCRを利用した、ドライバーDNAに存在しないテストDNA中の配列を選択的に増幅することを可能とする方法であり、上述のその他の方法と同様に本発明において用いることができる。より詳細な手順については、Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7及びSchutte et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5950-4を参照することができる。
- [0081] 以上のようにして検出、単離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該前駆細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的な遺伝子を上述の各種公知の方法によりベクター等に挿入し、配列決定、発現解析を行うこともできる。
- [0082] <ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の成熟を指標としたスクリーニング>
- 本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による該前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む、スクリーニング方法が提供される。本方法によりスクリーニングされる化合物は、ドーパミン産生ニューロンの分化、増殖等を調節する機能を示すことから、ドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり、有用と考えられる。本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞としては、本発明のポリヌクレオチドプローブまたは抗体を用いて選択される細胞、及び、これらの細胞を増殖および／または分化誘導して得られる細胞が挙げられる。
- [0083] ここで、「被験物質」とはどのような化合物であってもよいが、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体

、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーが挙げられる。

- [0084] 細胞の分化や増殖は、被験物質と接触させない場合における細胞の状態と比較することにより検出することができる。細胞の分化や増殖は、顕微鏡下において形態学的な観察を行うことができ、また、細胞で産生されるドーパミン等の物質を検出、定量して検出して行うことができる。

- [0085] <Lrp4の発現制御領域解析>

Lrp4の発現制御領域は、Lrp4の遺伝子配列を利用してゲノムDNAから公知の方法によってクローニングすることができる。例えば、S1マッピング法のような転写開始点の特定方法(細胞工学 別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 東京大学医科学研究所制癌研究部編, 秀潤社 (1993) pp.362-374)が公知であり、利用できる。一般に、遺伝子の発現制御領域は、遺伝子の5'末端の15~100bp、好ましくは30~50bpをプローブDNAとして利用して、ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる(本発明においては、配列番号:1または2の塩基全部またはその1部)。このようにして得られるクローンは、10kbp以上の5'非翻訳領域を含むものであるので、次にエキソヌクレアーゼ等により処理し短縮化または断片化する。最後に、短縮された発現制御領域の候補を含む配列部分をレポーター遺伝子を利用して、その発現の有無、強さ、制御等について評価し、Lrp4の発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を決定することができる。

- [0086] 遺伝子の発現制御領域は、Neural Network等のプログラム(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996))を用いて予測することもできる。さらに、発現制御領域の活性最小単位を予測するプログラム(<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.htm>; Prestidge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-32)も公知であり、用いることができる。

- [0087] このようにして単離された、Lrp4遺伝子の発現制御領域は、in vivoでドーパミン産

生ニューロン増殖前駆細胞特異的に所望の蛋白質を産生するのに利用することもできる。

[0088] <Lrp4に対するリガンド>

Lrp4ポリペプチドは、膜貫通ドメインを有することから、天然において細胞膜中に埋め込まれた状態で存在すると考えられる。Lrp4は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞で発現されていることから、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられる。従って、Lrp4に対するアゴニストやアンタゴニスト等の機能を示す可能性があるリガンドは、ドーパミン産生ニューロンのin vivo、ex vivo及びin vitroにおける分化を制御するのに利用できる可能性がある。Lrp4ポリペプチドに対するリガンドの同定においては、まず、Lrp4ポリペプチドと候補化合物とを接触させ、結合の有無を検定する。この際、Lrp4ポリペプチドを担体に固定したり、細胞膜に埋め込まれた状態に発現させたりして用いることもできる。候補化合物としては特に制限はなく、遺伝子ライブラリーの発現産物、海洋生物由来の天然成分、各種細胞の抽出物、公知化合物及びペプチド、植物由来の天然成分、生体組織抽出物、微生物の培養上清、並びにファージディスプレイ法等によりランダムに製造されたペプチド群(J. Mol. Biol. 222: 301-10 (1991))等が含まれる。また、結合の検出を容易にするために、候補化合物は標識しても良い。

[0089] <Lrp4の発現抑制>

本発明により、Lrp4 mRNAがドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞で一過性に発現されることが明らかにされたことから、Lrp4が前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられた。従って、Lrp4遺伝子の発現を阻害するものは、ドーパミン産生ニューロンのin vivo、ex vivo及びin vitroにおける分化を制御するのに利用できる可能性がある。遺伝子の発現を阻害し得るものとして、例えば、アンチセンス、リボザイム及び2本鎖RNA(small interfering RNA; siRNA)が挙げられる。従って、本発明はこのようなアンチセンス、リボザイム及び2本鎖RNAを提供するものである。

[0090] アンチセンスが標的遺伝子の発現を抑制する機構としては、(1)3重鎖形成による転写開始阻害、(2)RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位との

ハイブリッド形成による転写抑制、(3)合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、(4)イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(5)スプライソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp.319-347 (1993))。

[0091] 本発明のLrp4アンチセンス核酸は、上述の(1)～(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用することができる。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸は、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、Lrp4ポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21)等により調製することができる。

[0092] リボザイムとは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)及びスモールリボザイム(small liboyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に5'-リン酸と3'-ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる5'-スプライス部位でのトランスエステル化反応を行うグループIイントロンRNA、(2)自己スプライシ

ングをリアット構造を経る二段階反応で行うグループIIイントロンRNA、及び(3)加水分解反応によるtRNA前駆体を5'側で切断するリボヌクレアーゼPのRNA成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp程度)であり、RNAを切断して、5'-ヒドロキシル基と2'-3'環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知であり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くのRNA配列と相補的となるように設計することにより、標的RNA中の塩基配列UC、UUまたはUAを認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990)蛋白質核酸酵素35: 2191; Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)。

- [0093] 本発明のアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、またはnaked DNAとしてex vivo法またはin vivo法により遺伝子治療に用いることもできる。
- [0094] RNA干渉とは、二本鎖の人工RNAを細胞に導入することにより、同じ塩基配列を有するRNAが分解される現象である(Fire et al. (1998) Nature 391: 806-11)。本発明のsiRNAは、Lrp4のmRNAの転写を阻害する限り、特に限定されない。通常、siRNAは、標的mRNAの配列に対するセンス鎖及びアンチセンス鎖の組合せであり、少なくとも10個から標的mRNAと同じ個数までのヌクレオチド長を有する。好ましくは、15～75個、より好ましくは18～50個、さらに好ましくは20～25個のヌクレオチド長である。
- [0095] Lrp4発現を抑制するために、siRNAは公知の方法により細胞に導入することができる。例えば、siRNAを構成する二本のRNA鎖を、一本鎖上にコードするDNAを設計し、該DNAを発現ベクターに組み込み、細胞を該発現ベクターで形質転換し、siRNAを

ヘアピン構造を有する二本鎖RNAとして細胞内で発現させることができる。トランスフェクションにより持続的にsiRNAを産生するプラスミド発現ベクターも設計されている(例えば、RNAi-Ready pSIREN Vector、RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector (BD Biosciences Clontech))。

- [0096] siRNAの塩基配列は、例えば、Ambion website(http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)のコンピュータプログラムを用いて設計することができる。機能的siRNAをスクリーニングするためのキット(例えば、BD Knockout RNAi System(BD Biosciences Clontech))等も市販されており利用可能である。

実施例

- [0097] 以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、これらの実施例は本発明をいかなる意味でも限定するものではない。

- [0098] [実施例1] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子の単離及び配列解析
ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに二つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション(N-RDA)法により同定した。単離した断片の一つはLrp4/CorinをコードするcDNA断片であった。Lrp4はII型膜貫通蛋白質をコードしている(図1)。

- [0099] (1)N-RDA法

(1)-1. アダプターの調製

下記のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、100 μ Mに調製した。

(ad2: ad2S+ad2A、ad3: ad3S+ad3A、ad4: ad4S+ad4A、ad5: ad5S+ad5A、ad13: ad13S+ad13A)

ad2S: cagctccacaacctacatcattccgt (配列番号:5)

ad2A: acggaatgatgt (配列番号:6)

ad3S: gtccatcttctctctgagactctgt (配列番号:7)

ad3A: accagagtctca (配列番号:8)

ad4S: ctgatgggtgtcttctgtgagtgtgt (配列番号:9)

ad4A: acacactcacag (配列番号:10)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgtagacagt (配列番号:11)

ad5A: actgtcacactg (配列番号:12)

ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgatcgt (配列番号:13)

ad13A: acgatcgacagt (配列番号:14)

[0100] (1)-2. cDNA合成

日本SLCより入手したマウス12.5日胚より中脳腹側を切り出し、さらに背腹方向に2つの領域に切り分けた。RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて全RNAを調製し、cDNA synthesis kit (TAKARA)を用いて二本鎖cDNAを合成した。制限酵素RsaIで消化したのち、ad2を付加し、ad2Sをプライマーとして、15サイクルのPCRでcDNAを増幅した。増幅条件は72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を15サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。N-RDAのPCRはすべて以下の反応液組成で行った。

10×ExTaq	5 μ l
2.5mM dNTP	4 μ l
ExTaq	0.25 μ l
100 μ M primer	0.5 μ l
cDNA	2 μ l
蒸留水	38.25 μ l

[0101] (1)-3. Driverの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。1回のサブトラクションに3 μ gずつ使用した。

[0102] (1)-4. Testerの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。60ngのRsaI消化cDNAにad3を付加した。

[0103] (1)-5. サブトラクション1回目

上記3及び4で作製したTesterおよびDriverを混合し、エタノール沈殿した後に、1xPCR buffer 1 μ lに溶解した。98℃5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 1 μ lを加えた。さらに98℃5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

[0104] ハイブリダイズさせたcDNAをad3Sをプライマーとして10サイクルのPCRで増幅した後(72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を10サイクル行った)、Mung Bean Nuclease (TAKARA)で消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。さらに13サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を13サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。

[0105] (1)-6. 均一化

サブトラクション1回目で増幅したcDNA 8ngに2xPCR buffer 1 μ lを加えた。98℃5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 2 μ lを加えた。さらに98℃5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

[0106] ハイブリダイズさせたcDNAをRsaIで消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。これをad3Sをプライマーとして11サイクルのPCRで増幅した後(94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を11サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした)RsaIで消化し、ad4を付加した。

[0107] (1)-7. サブトラクション2回目

上記6でad4を付加したcDNA 20ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したcDNAにad5を付加した。

[0108] (1)-8. サブトラクション3回目

上記7でad5を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したcDNAにad13を付加した。

[0109] (1)-9. サブトラクション4回目

上記8でad13を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、以下、

上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。増幅したcDNAをpCRII (Invitrogen) にクローニングし、ABI3100シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。

[0110] [実施例2] Lrp4遺伝子の発現解析

次に、Lrp4遺伝子を用いて以下のプロトコールによりin situハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。

[0111] まず、マウス12.5日胚をOCTで包埋し、厚さ16 μ mの新鮮凍結切片を作製した。スライドガラス上で乾燥させた後に4%PFAで室温30分間固定した。PBSで洗浄した後、ハイブリダイゼーション(1 μ g/mlDIG化RNAプローブ、50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS, 50 μ g/ml yeast RNA, 50 μ g/ml Heparin)を65度で40時間行った。その後、洗浄(50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS)を65度で行い、RNase処理(5 μ g/ml RNase)を室温5分間行った。0.2xSSCで65度の洗浄、1xTBSTで室温の洗浄ののち、ブロッッキング(Blocked reagent: Roche)を行った。アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体(DAKO)を反応させ、洗浄(1xTBST、2mM Levamisole)の後、NBT/BCIP (DAKO)を基質として発色させた。

[0112] in situハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期であるE12.5で、Lrp4 mRNAは中脳から後脳、脊髄にかけての腹側中心部に特異的発現していることが示された。後脳から脊髄にかけては、Shh mRNAと同様の発現パターンを示し、オーガナイザー領域である底板(floor plate)に特異的であることが明らかになった(図2及び5)。中脳ではShh mRNA発現領域の中でもより中心部にのみ発現が見られた(図3及び5)。

[0113] ニューロンの成熟マーカーであるNCAM mRNAと比較した結果、Lrp4 mRNA発現細胞はNCAM mRNA陰性の脳室領域(Ventricular Zone (VZ))内の増殖前駆細胞であった。さらにドーパミン産生ニューロンのマーカーであるTH mRNAの発現と比較すると、TH mRNAは外套層(mantle layer(ML))にのみ発現しているので、同一の細胞で両者の発現が認められることはないものの、背-腹軸方向での発現領域は完全に一致していた(図3及び5)。一般に神経管(neural tube)内の神経細胞は、まずVZ内で増殖し、分化開始とともに分裂を停止し、その後すぐ外側のMLに移動したのちに成熟することが知られている。従って、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞は、TH発

現領域のすぐ内側のVZ内で増殖し、分裂停止後に外側に移動してからTH mRNAを発現すると考えられる。即ち、Lrp4 mRNAは、中脳ではドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的に発現すると考えられる(図4及び6)。

[0114] [実施例3] ES細胞より分化誘導したドーパミン産生ニューロンにおけるLrp4の発現
次にES細胞をin vitroでドーパミン産生ニューロンに分化誘導させた場合にLrp4が発現するかどうか検討した。

[0115] まず、SDIA法(Kawasaki et. al. (2000) Neuron 28(1): 31-40)によりES細胞よりドーパミン産生ニューロンへの分化誘導を行った(図7上参照)。誘導後4、6、8、10、12日後にそれぞれ細胞を回収し、RNeasy mini kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを回収し、RT-PCRを行った。RT-PCRにおいては、最初に1 μ gのtotal RNAに対して、RNA PCR kit(TaKaRa)を用いてcDNA合成を行った。このうち10ng、1ng、0.1ng相当分のcDNAを鋳型に用いて以下の反応系でPCRを行った。

10×ExTaq	2 μ l
2.5mM dNTP	1.6 μ l
ExTaq	0.1 μ l
100 μ M プライマー	各0.2 μ l
cDNA	1 μ l
蒸留水	14.9 μ l

[0116] 94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を35サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。

以下の配列のプライマーを使用した。

[0117] Lrp4: TAGTCTACCACTGCTCGACTGTAACG(配列番号:15)/CAGAGTGAACC
CAGTGGACATATCTG(配列番号:16)
TH: GTTCCCAAGGAAAGTGTCAGAGTTGG(配列番号:17)/GAAGCTGGAAAG
CCTCCAGGTGTTCC(配列番号:18)
DAT: CTCCGAGCAGACACCATGACCTTAGC(配列番号:19)/AGGAGTAGGGC
TTGTCTCCCAACCTG(配列番号:20)

[0118] そして、RT-PCRによる発現解析の結果、Lrp4は、ES細胞(CCE)およびストローマ

細胞 (PA6) には発現していないが、分化誘導の結果、THと同様に4日目から発現が誘導されることが明らかになった(図8)。従って、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、胎児中脳由来のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞だけでなく、in vitroでES細胞より分化誘導したドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を分離する際にもマーカーとして有用である。

[0119] [実施例4]Lrp4タンパク質の発現解析

次に、Lrp4遺伝子のうち、細胞外領域をコードする遺伝子配列を用いて、以下のプロトコールにより抗Lrp4抗体を作製し、免疫組織染色による発現解析を行った。

[0120] まず、Lrp4遺伝子のうち、細胞外領域(161-502アミノ酸)をコードする遺伝子配列を293E細胞に遺伝子導入して、Lrp4タンパク質の細胞外領域を発現させて回収した。回収したタンパク質をハムスターに免疫したのち、リンパ球細胞を取り出してミエローマ細胞とフュージョンさせた。フュージョンさせた細胞を培養し、その培養上清を得た。次にマウス12.5日胚を4%PFA/PBS(-)で4℃、2時間固定したのち、20%ショ糖/PBS(-)で4℃、一晚置換し、OCTで包埋した。厚さ12 μ mの切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた後、室温で30分乾燥させ、PBS(-)で再び湿潤させた。その後、ブロッッキング(10% normal donkey serum、10% normal goat serum/ブロックエース)を室温、20分間行い、作製した抗Lrp4モノクローナル抗体(FERM BP-10315、およびFERM BP-10316を混合して用いた(培養上清1/4希釈ずつ、10% normal donkey serum、10% normal goat serum、2.5%ブロックエース/PBS))および抗TH抗体(Chemicon、0.7 μ g/ml、10% normal donkey serum、10% normal goat serum、2.5%ブロックエース/PBS)を室温、1時間反応させた後、さらに4℃、一晚反応させた。0.1%Triton X-100/PBS(-)で、室温、10分間の洗浄を4回行った。Cy3標識抗ハムスターIgG抗体、FITC標識抗マウスIgG抗体、(Jackson、10 μ g/ml、10% normal donkey serum、10% normal goat serum、2.5%ブロックエース/PBS)を室温、1時間反応させ、同様に洗浄を行った後、PBS(-)によって室温、10分間洗浄し、封入した。

[0121] そして、作製した抗Lrp4モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色による発現解析の結果、in situハイブリダイゼーションによる発現解析の結果と同様に、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期であるE12.5で、中脳腹側に発現が認められた(図8)。

ドーパミン産生ニューロンのマーカーであるTHタンパク質の発現と比較すると、Lrp4タンパク質は、THタンパク質が発現する中脳最腹側のVZ側に発現していることから、Lrp4タンパク質は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現していると考えられた。

[0122] 次に、抗Lrp4モノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーによるLrp4発現細胞の検出を行った。

[0123] まず、SDIA法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、細胞分散バッファー (Invitrogen)を用いて分散させた後、固定・透過処理せずに、抗Lrp4モノクローナル抗体 (FERM BP-10315、およびFERM BP-10316を混合して用いた (培養上清1/4 希釈ずつ、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地))で4℃、20分間染色した。その後、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地で4℃、3分間の洗浄を3回行い、ビオチン標識抗ハムスターIgG抗体 (Jackson、10 μ g/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地)で4℃、20分間染色し、同様に洗浄したのち、PE標識ストレプトアビジン (Pharmingen、20 μ g/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地)で4℃、20分間染色し、同様に洗浄した。染色後、フローサイトメーターにてLrp4発現細胞を検出した。

[0124] そして、作製した抗Lrp4モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによるLrp4発現細胞の検出の結果、Lrp4タンパク質を発現する集団を検出した (図9)。固定・透過処理することなく、Lrp4タンパク質発現細胞を検出できることから、セルソーターを付属したフローサイトメーターを用いることにより、Lrp4タンパク質発現細胞を生細胞の状態で分離することが可能であると考えられた。Lrp4タンパク質は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現していると考えられることから、抗Lrp4抗体は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離に有用であると考えられた。

[0125] [実施例5]抗体によるLrp4発現細胞の分離

次に抗Lrp4抗体を用いて分離したLrp4タンパク質陽性細胞の性状を解析した。

[0126] まず、E12.5マウス胎児中脳腹側領域、およびSDIA法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、実施例4と同様の方法で抗Lrp4抗体で染色し、セルソーターによりLrp4陽性細胞および陰性細胞を分離した。分離直後の細胞からRNeasy mini kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを回

収、cDNAを合成し、実施例1と同様の方法でcDNAを増幅して、RT-PCRの鋳型に用いた。増幅cDNA 4ng、0.4ng、0.04ng相当分のcDNAを鋳型に用いて以下の反応系でPCRを行った。

10×ExTaq	1 μ l
2.5mM dNTP	0.8 μ l
ExTaq	0.05 μ l
100 μ M プライマー	各0.1 μ l
cDNA	1 μ l
蒸留水	6.95 μ l

[0127] 94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を26サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。

以下の配列のプライマーを使用した。

[0128] Lrp4: TAGTCTACCACTGCTCGACTGTAACG(配列番号:15)/CAGAGTGAACC
CAGTGGACATATCTG(配列番号:16)

TH: GTTCCCAAGGAAAGTGTCAGAGTTGG(配列番号:17)/ GAAGCTGGAAA
GCCTCCAGGTGTTCC(配列番号:18)

Nurr1: CACTCCTGTGTCTAGCTGCCAGATGC(配列番号:21)/AGTGCGAACA
CCGTAGTGCTGACAGG(配列番号:22)

Nestin: GATGAAGAAGAAGGAGCAGAGTCAGG(配列番号:23)/ATTCACCTTGC
TCTGACTCCAGGTGTTGG(配列番号:24)

MAP2: CCATGATCTTTCCCCTCTGGCTTCTG(配列番号:25)/TTTGGCTGGA
AAGGGTGACTCTGAGG(配列番号:26)

[0129] そして、RT-PCRによる発現解析の結果、予想通り、増殖前駆細胞マーカーであるNestinの発現が認められたが、Lrp4タンパク質陽性細胞集団中に、分裂停止後のマーカーであるMAP2を発現する細胞も含まれることが明らかになった(図10)。したがって、Lrp4タンパク質の発現は、mRNAの発現停止後にも維持されており、Lrp4タンパク質は、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞だけでなく、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分離するためのマーカーとしても有用であることが明ら

かになった(図11)。さらに、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーであるNurr1やTHが、Lrp4陰性集団に比べて高レベルに発現していたことから、確かにLrp4陽性細胞がドーパミン産生ニューロン系列の前駆細胞であることも確認された(図10)。

- [0130] 次に、Lrp4抗体で分離したLrp4タンパク質陽性細胞集団中にどの程度の割合で増殖前駆細胞と分裂停止後前駆細胞が含まれるのかを検討した。
- [0131] 分離した細胞をpoly-L-ornithine (Sigma, 0.002% in PBS)、laminin (Invitrogen, 5 μ g/ml in PBS)、fibronectin (Sigma, 5 μ g/ml in PBS)コートしたスライドガラス上に播き、40分間、37℃、N2 (Invitrogen, 1x)、B27 (Invitrogen, 1x)、アスコルビン酸 (Sigma, 200 μ M) BDNF (Invitrogen, 20ng/ml) / SDIA分化培地培地中でインキュベートして付着させた。付着した細胞を4%PFA/PBSで4℃、20分間固定し、PBSで4℃、10分間の洗浄を2回行った。その後、0.3% Triton X-100/PBSで室温、15分間の透過処理を行い、10% normal donkey serum/ブロックエースで室温、20分間のブロッキングを行った。続いて、抗nestin抗体 (Chemicon, 2 μ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS)、抗 β III-tubulin抗体 (BABCO, 1/2000、0.5 μ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で、室温、1時間反応させ、引き続き、4℃、一晚反応させた。翌日、0.1% Triton X-100/PBSで、室温、5分間の洗浄を3回行った後、FITC標識した抗マウスIgG抗体、Cy5標識した抗ラビットIgG抗体 (いずれもJackson, 10 μ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で室温、30分間反応させた。その後、同様に洗浄し、PBSで室温、5分間洗浄し、封入して観察した。
- [0132] また、分離した細胞を同様にスライドガラス上に播き、上記の培地にBrdU (Roche, 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II, 1x) を添加した培地中で、37℃、18時間培養した後、同様にブロッキングまでを行い、2N HClで37℃、20分間反応させた後、PBSで3回洗浄し、抗BrdU抗体、DNase (Roche, 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II, 1 x conc. in incubation buffer) で37℃、30分間反応させた。さらに、抗BrdU抗体 (Sigma, 44 μ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で室温、1時間反応させ、引き続き、4℃、一晚

反応させた。翌日、0.1% Triton X-100/PBSで、室温、5分間の洗浄を3回行った後、FITC標識した抗マウスIgG抗体、(Jackson、10 μ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS)で室温、30分間反応させた。その後、同様に洗浄し、封入して観察した。

[0133] そして、マーカー染色の結果、Lrp4陽性細胞の多くは、Nestin陽性の増殖前駆細胞であり、一部が分裂停止後マーカー β III-tubulin陽性であることが明らかになった(図12)。また、分離した細胞は、高頻度にBrdUを取り込み、実際にin vitroで増殖することが確認された(図13)。

[0134] 次に、分離したLrp4陽性細胞がドーパミン産生ニューロンに分化することを確認した。

分離した細胞をpoly-L-ornithine (Sigma、0.002% in PBS)、laminin (Invitrogen、5 μ g/ml in PBS)、fibronectin (Sigma、5 μ g/ml in PBS)コートしたスライドガラス上に播き、N2 (Invitrogen、1x)、B27 (Invitrogen、1x)、アスコルビン酸 (Sigma、200 μ M) BDNF (Invitrogen、20 ng/ml)、bFGF (R&D、10 ng/ml) / SDIA分化培地中で、37°C、24時間インキュベートした。その後、上記の培地よりbFGFを除いた培地でさらに6日間培養した。培養した細胞を4%PFA/PBSで4°C、20分間固定し、PBSで4°C、10分間の洗浄を2回行った。その後、0.3% Triton X-100/PBSで室温、15分間の透過処理を行い、10% normal donkey serum/ブロックエースで室温、20分間のブロッキングを行った。続いて、抗TH抗体 (Chemicon、0.3 μ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS)、抗 β III-tubulin抗体 (BABC0、1/2000、0.5 μ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS)で、室温、1時間反応させ、引き続き、4°C、一晚反応させた。翌日、0.1% Triton X-100/PBSで、室温、5分間の洗浄を3回行った後、FITC標識した抗マウスIgG抗体、Cy5標識した抗ラビットIgG抗体(いずれもJackson、10 μ g/ml、10% normal donkey serum、2.5%ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS)で室温、30分間反応させた。その後、同様に洗浄し、PBSで室温、5分間洗浄し、封入して観察した。

[0135] そして、分離した細胞をin vitroで培養した結果、対照である分離していない細胞に比べて明らかに多くのTHタンパク質陽性ドーパミン産生ニューロンが誘導された。し

たがって、Lrp4陽性細胞は、確かにドーパミン産生ニューロン系列の前駆細胞であり、in vitroで成熟可能であることが明らかになった(図14)。

[0136] [実施例6]分離したLrp4タンパク質陽性細胞のパーキンソン病モデルマウス線状体への移植

抗Lrp4モノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーによりLrp4発現細胞の分離を行い、当該細胞をパーキンソン病モデルマウス線状体へ移植した。

[0137] まず、SDIA法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、細胞分散バッファー(Invitrogen)を用いて分散させた後、固定・透過処理せずに、実施例4で作製した抗Lrp4モノクローナル抗体(FERM BP-10315、およびFERM BP-10316を混合して用いた(培養上清 1/4 希釈ずつ、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地))で4℃、20分間染色した。その後、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地で4℃、3分間の洗浄を3回を行い、ビオチン標識抗ハムスターIgG抗体(Jackson、10 μ g/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地)で4℃、20分間染色し、同様に洗浄したのち、PE標識ストレプトアビジン(Pharmingen、20 μ g/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/SDIA分化培地)で4℃、20分間染色し、同様に洗浄した。染色後、フローサイトメーターにてLrp4発現細胞を分離した。

[0138] 次に、分離したLrp4タンパク質陽性細胞をパーキンソン病モデルマウス線状体へ移植し、脳内でのLrp4タンパク質陽性細胞の性状を解析した。

まず、12週齢のマウス(slc)の片側のmedial forebrain bundleに6-OHDA(sigma、2 μ g/ μ l)を1.25 μ l注入して、中脳から線状体へ投射するドーパミン産生ニューロンを死滅させることにより、パーキンソン病モデルマウスを作製した。モデルマウス作製後2週間目に、6-OHDAを注入した側の線状体にLrp4タンパク質陽性細胞を1匹あたり 3×10^4 個移植した。移植したLrp4タンパク質陽性細胞は、CAGプロモーター(Niwa et al. (1991) Gene. 108: 193-200)制御下でEGFP遺伝子を発現するように遺伝子導入したES細胞をSDIA法によりin vitroにおいて分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、実施例4と同様の方法で抗Lrp4抗体を用いて染色し、セルソーターにより分離して得た。

[0139] 移植後3週間目に10 % Urethan in saline、500 μ lを腹腔内投与して麻酔をかけ、麻酔が効いた後、開胸して、左心室より生理食塩水(大塚)30 mlを注入して灌流した後、4% PFA/PBS(-)30 mlで灌流固定した。固定後、脳を取り出して、更に8時間、4 % PFA/PBS(-)中で浸漬固定を行った。その後、2 mm厚にスライスし、20-40 % ショ糖/PBS(-)中で一晩置換し、OCT中に包埋した。厚さ10-12 μ mの切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた後、室温で30分乾燥させ、PBS(-)で再び湿潤させた。その後、ブロッキング(10 % normal donkey serum/ブロックエース)を室温、20分間行い、抗GFP抗体(Molecular probes、20 μ g/ml、10% normal donkey serum、10 % ブロックエース/PBS)、抗MAP2抗体(Sigma、マウス腹水、100倍希釈、10 % normal donkey serum、10 % ブロックエース/PBS)または抗TH抗体(Chemicon、1 μ g/ml、10 % normal donkey serum、10 % ブロックエース/PBS)を室温、1時間反応させた後、さらに4℃、一晩反応させた。その後、0.1 % Triton X-100/PBS(-)で、室温、10分間の洗浄を4回行った。次に、Alexa Fluor488標識抗ウサギIgG抗体(Molecular probes、4 μ g/ml、10 % normal donkey serum、10 % ブロックエース/PBS)、Cy3標識抗マウスIgG抗体、(Jackson、10 μ g/ml、10% normal donkey serum、10%ブロックエース/PBS)またはCy5標識抗ヒツジIgG抗体、(Jackson、10 μ g/ml、10% normal donkey serum、10%ブロックエース/PBS)を室温、1時間反応させた後、同様に洗浄を行い、PBS(-)によって室温、10分間洗浄し、封入した。

そして、免疫組織染色による各種マーカー発現解析を行った。

[0140] その結果、まず、移植したマウスの線状体内にEGFP陽性細胞が認められた(表1)。このことから、移植したLrp4タンパク質陽性細胞は、パーキンソン病モデルマウスの線状体において、生着しているものと考えられる。

また、生着したほとんどの細胞は、成熟したニューロンのマーカーであるMAP2陽性であり、EGFP陽性の軸索が線状体内に長く伸展している様子も認められた(表1および図16)。

[0141] [表1]

	EGFP+ 細胞	TH+ 細胞	TH+
#6 sec.No.20	95	19	20%
#7 sec.No.12	131	21	16%

(表1は、移植したLrp4陽性細胞のTH陽性細胞へのin vivoにおける分化を示す。

#6 マウスおよび#7 マウスは、6-OHDAによるドーパミン産生ニューロンの破壊後 2 週間後にLrp4タンパク質陽性細胞を移植され、移植後3週間目に灌流された。)

[0142] このことから、移植したLrp4タンパク質陽性細胞が神経前駆細胞であったのに対し、生着したほとんどの細胞が成熟した神経細胞へと分化および成熟したことが示された。また、これら生着した細胞の約20%は、TH陽性であったことから、移植したLrp4タンパク質陽性細胞の少なくとも一部は、ドーパミン産生ニューロンへと分化したことが強く示唆された。

[0143] したがって、本発明により分離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、脳内に移植することによって、ドーパミン産生ニューロンへの分化が可能であり、本発明により分離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、治療に有効であると考えられる。

[0144] [実施例7] 5-stage 法を用いてES細胞を分化誘導したドーパミン産生ニューロンにおけるLrp4の発現

5-stage 法を用いてin vitroにおいてES細胞をドーパミン産生ニューロンに分化誘導させた場合にLrp4が発現するかどうか検討した。

[0145] まず、5-stage法 (Lee et. al. (2000) Nat.Biotech. 18: 675-679、mouse dopaminergic neuron differentiation kit (R&D Systems)) によりES細胞 (CCE) よりドーパミン産生ニューロンへの分化誘導を行った。Stage1の2日目、stage2の4日目、stage3の6日目、stage4の4、6日目、stage5の4、7日目にそれぞれ細胞を回収し、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを回収し、RT-PCRを行った。RT-PCRにおいては、最初に1 μ gのtotal RNAに対して、RNA PCR kit (TaKaRa) を用いてcDNA合成を行った。このうち10 ng、1 ng、0.1 ng相当分のcDNAを鋳型に用いて以下の反応系でPCRを行った。

10×ExTaq	2 μ l
2.5mM dNTP	1.6 μ l

ExTaq	0.1 μ l
100 μ M プライマー	各0.2 μ l
cDNA	1 μ l
蒸留水	14.9 μ l

[0146] 94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を32サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。

以下の配列のプライマーを使用した。

[0147] Lrp4: TAGTCTACCACTGCTCGACTGTAACG(配列番号:15)/CAGAGTGAACC
CAGTGGACATATCTG(配列番号:16)

TH: GTTCCCAAGGAAAGTGTCTCAGAGTTGG(配列番号:17)/GAAGCTGGAAAG
CCTCCAGGTGTTCC(配列番号:18)

[0148] そして、RT-PCRによる発現解析の結果、Lrp4は、未分化なES細胞の状態であるstage1においては発現していないが、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞が発生するstage4において、発現が誘導されることが明らかになった(図17A)。

[0149] 次に、5-stage 法により、in vitroにおいてES細胞をドーパミン産生ニューロンに分化誘導させた場合における、抗Lrp4モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによるLrp4発現細胞の検出を行った。

[0150] まず、5-stage法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群(stage4、7日目)を、細胞分散溶液Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc.)を用いて分散させた後、固定・透過処理せずに、抗Lrp4モノクローナル抗体(FERM BP-10315、およびFERM BP-10316を混合して用いた(培養上清 1/2 希釈ずつ))で4℃、20分間染色した。その後、1%ウシ胎児血清、1 mM EGTA、4.5 mg/ml グルコース、40 ng/ml DNase I/Hanks'Balanced Salt Solution Ca・Mg不含(HBSS-)で4℃、3分間の洗浄を3回行い、PE標識抗ハムスターIgG抗体(8 μ g/ml (BD Bioscience)、1%ウシ胎児血清、1 mM EGTA、4.5 mg/ml グルコース、40 ng/ml DNase I/Hanks'Balanced Salt Solution Ca・Mg不含(HBSS-))で4℃、30分間染色し、同様に洗浄した。染色後、フローサイトメーターにてLrp4発現細胞を検出した。

[0151] そして、抗Lrp4モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによるLrp4発現細胞

胞の検出の結果、5-stage法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群中にLrp4タンパク質を発現する集団を検出した(図17B)。したがって、SDIA法だけでなく、5-stage法によってES細胞より分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞でもLrp4が発現し、細胞分離のマーカーとして有用であると考えられた。

[0152] [実施例8]抗体により分離したLrp4発現細胞のin vitroにおける分化成熟

抗Lrp4抗体を用いて分離したLrp4タンパク質陽性細胞がin vitroにおいてドーパミン産生ニューロンに分化するか否かを検討した。

[0153] 5-stage法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、実施例4と同様の方法で抗Lrp4抗体を用いて染色し、セルソーターによりLrp4陽性細胞を分離した。分離した細胞をpoly-L-ornithine (Sigma、0.002% in PBS)、fibronectin (Sigma、5 μ g/ml in PBS) でコートしたスライドガラス上に播き、N2 (Invitrogen、1x)、アスコルビン酸 (Sigma、200 μ M) BDNF (R&D Systems、20 ng/ml) /DMEM/F12中で、37℃、7日間インキュベートした。その後、培養した細胞を2% PFA、0.15%ピクリン酸/PBSで4℃、20分間固定し、PBSで4℃、10分間の洗浄を2回行った。その後、0.3% Triton X-100/PBSで室温、30分間の透過処理を行い、10% normal donkey serum、10% normal goat serum/ブロックエースで室温、20分間のブロッキングを行った。続いて、抗TH抗体 (Chemicon、0.4 μ g/ml、10% normal donkey serum、10% normal goat serum、2.5% ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS)、抗MAP2抗体 (Sigma、腹水1/200、10% normal donkey serum、10% normal goat serum、2.5% ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で、室温、1時間反応させ、引き続き、4℃、一晩反応させた。翌日、0.1% Triton X-100/PBSで、室温、10分間の洗浄を4回行った後、FITC標識した抗マウスIgG抗体、Cy3標識した抗ラビットIgG抗体 (いずれもJackson、10 μ g/ml、10% normal donkey serum、10% normal goat serum、2.5% ブロックエース、0.1% Triton X-100/PBS) で室温、30分間反応させた。その後、同様に洗浄し、PBSで室温、5分間洗浄し、封入して観察した。

[0154] そして、分離したLrp4陽性細胞をin vitroで培養した結果、THタンパク質陽性の多くのドーパミン産生ニューロンが誘導された(図17C)。したがって、5-stage法によって

誘導されたLrp4陽性細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞であり、in vitroで成熟可能であることが明らかになった。Lrp4は、2つの異なる分化方法(SDIA法、5-stage法)により誘導されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞のいずれにおいても発現しており、抗Lrp4抗体を用いていずれのドーパミン産生ニューロン前駆細胞も分離できた。これらのことから、Lrp4は、細胞の由来を問わず、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーとして有用であると考えられた。また、5-stage法は、動物由来細胞および成分との接触を行わずにドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分化誘導できる方法であり、臨床応用が期待されている。Lrp4は、当該方法において細胞分離マーカーとして有用であることから、パーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に応用できる可能性が高いと考えられる。

[0155] [実施例9]抗Lrp4抗体を用いたドーパミン産生ニューロン前駆細胞分離による未分化ES細胞の除去

ES細胞に由来する移植細胞を調製する際に、安全性の上で最も重要なことは奇形腫の原因となる未分化なES細胞を除去することである。Lrp4は、未分化なES細胞には発現していないことから(実施例3)、Lrp4をマーカーに用いて分離することで、未分化ES細胞を除去できることが期待される。これを確認するために、SDIA法を用いてin vitroでES細胞より分化誘導した細胞からLrp4抗体を用いて分離した細胞中に未分化なES細胞が含まれるかどうかを、RT-PCRにより、ES細胞特異的な遺伝子であるERas(Nature. 2003 423(6939):541-5.)およびNanog(Cell. 2003 113(5):631-42.)の発現を調べることで検討した。

[0156] まず、実施例5と同様の方法で、SDIA法によりin vitroにおいてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群からセルソーターによりLrp4陽性細胞および陰性細胞を分離した。分離直後の細胞から全RNAを回収し、増幅cDNAを作製した。このうち4 ng、0.4 ng、0.04 ng相当分のcDNAを鋳型に用いて以下の反応系でPCRを行った。

10×ExTaq	1 μ l
2.5mM dNTP	0.8 μ l
ExTaq	0.05 μ l

100 μ M プライマー	各0.1 μ l
cDNA	1 μ l
蒸留水	6.95 μ l

[0157] 94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を26サイクル(Lrp4, Nestin)または30サイクル(Eras, Nanog)行い、最後に72℃で2分インキュベートした。

以下の配列のプライマーを使用した(Lrp4とNestinは実施例5に記載)。

[0158] ERas: TGCTCTCACCATCCAGATGACTCACC (配列番号:27)/ TGGACCATATCTGCTGCAACTGGTCC (配列番号:28)

Nanog: TCCAGCAGATGCAAGAACTCTCCTCC (配列番号:29)/ TTATGGAGCGGAGCAGCATTCCAAGG (配列番号:30)

[0159] その結果、Lrp4陽性細胞集団では、ES細胞に特異的に発現するERasおよびNanogの発現は認められず、一方、Lrp4陰性集団では、ERasおよびNanogの発現が検出された(図18)。このことから、Lrp4を用いた細胞分離により、SDIA法で分化誘導した細胞中に含まれる未分化なES細胞を除去できることが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0160] 本発明により、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する遺伝子として、Lrp4が同定された。より詳細にその発現について調べた結果、Lrp4 mRNAは、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に、Lrp4蛋白質は、分裂停止前後の細胞を含むドーパミン産生ニューロン前駆細胞に、それぞれ特異的に発現していることが確認された。そこで、細胞における該Lrp4 mRNAまたはLrp4ポリペプチドの発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適したドーパミン産生ニューロン系列の細胞を選択することが可能となった。本発明のようにLrp4をマーカーとして細胞を得た場合には、成熟した細胞の求められる治療等において使用する場合であっても、in vitroで最適な状態へと容易に分化させることができる。さらに、本発明の方法により得られるドーパミン産生ニューロン前駆細胞により、該細胞に特異的に発現している遺伝子を単離することが可能である。さらに、該細胞は、パーキンソン病

等の神経変性疾患に対する医薬を開発する上でも有用と考えられる。特に、Lrp4 mRNAを指標として得られるドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞という、ニューロン形成における初期の前駆細胞は、さらに、ニューロンの成熟過程、即ち、成熟過程に関与する種々の因子を明らかにするのに役立つ。このような因子の解明は、神経変性疾患の治療に大きく貢献することが予期される。さらに、該細胞の成熟を指標として、その過程を調節(阻害または促進)するような物質のスクリーニングに用いることもできる。

請求の範囲

- [1] 以下の(1)～(5)の塩基配列から選択される配列を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ。
 - (1)配列番号:1または2の塩基配列に相補的な塩基配列
 - (2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列
 - (3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列
 - (4)配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列
 - (5)上記(1)～(4)の配列中の少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列
- [2] ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、請求項1記載のポリヌクレオチドプローブとドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。
- [3] 以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン系列の細胞を選択する方法。
 - (1)請求項2記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法によりドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する工程
 - (2)上記(1)において選択された増殖前駆細胞を培養する工程
 - (3)上記(2)において培養された細胞を、分裂停止後のドーパミン産生ニューロンマーカーを利用してスクリーニングする工程
- [4] 請求項2の方法により選択されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞。
- [5] ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞特異的遺伝子及び増殖前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項4記載の増殖前駆細胞、または該増殖前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。
- [6] 成熟を指標としたドーパミン産生ニューロン系列の細胞の増殖及び/または分化を調節する化合物のスクリーニング方法であり、請求項4記載の増殖前駆細胞、または該

増殖前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による増殖前駆細胞若しくは前駆細胞の変化を検出する工程を含む方法。

- [7] 以下の(1)～(6)から選択されるポリペプチドに対する抗体。
 - (1)配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド
 - (2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (4)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド
 - (5)配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド
 - (6)上記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド
- [8] ハイブリドーマ(FERM BP-10315またはFERM BP-10316)により産生される、請求項7記載の抗体。
- [9] 請求項7または8記載の抗体からなる、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカー抗体。
- [10] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法であって、請求項7～9のいずれか一項に記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。
- [11] 以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン系列の細胞を選択する方法。
 - (1)請求項10記載の方法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程
 - (2)上記(1)において選択された前駆細胞を培養する工程
 - (3)上記(2)において培養された前駆細胞を、分裂停止後のドーパミン産生ニューロンマーカーを用いてスクリーニングする工程

- [12] 請求項10記載の方法により選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞。
- [13] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項12記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。
- [14] 成熟を指標としたドーパミン産生ニューロン系列の細胞の増殖及び/または分化を調節する化合物のスクリーニング方法であり、請求項12記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法。
- [15] 請求項4記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞または請求項12記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む、パーキンソン病を治療するためのキット。
- [16] 請求項4記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞または請求項12記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を患者の脳内に移植することを特徴とする、パーキンソン病の治療方法。
- [17] パーキンソン病を治療するためのキットを製造するための請求項4記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞または請求項12記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の使用。
- [18] ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を検出または選択する方法であって、以下の(1)～(4)のいずれかに記載の塩基配列からなる第一のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする第二のポリヌクレオチドを、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含む細胞試料に接触させる工程を含む方法。
 - (1) 配列番号:1または2に記載の塩基配列
 - (2) 配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる塩基配列
 - (3) 配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる塩基配列
 - (4) 配列番号:1または2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドからなる塩基配列

- [19] 第二のポリヌクレオチドが、少なくとも15塩基長を有する、請求項18記載の方法。
- [20] 請求項18または19に記載の方法により選択されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞集団。
- [21] 以下の(1)～(4)のいずれかに記載の塩基配列からなる第一のポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする第二のポリヌクレオチドを有効成分として含有する、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を識別するための試薬。
- (1)配列番号:1または2に記載の塩基配列
- (2)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる塩基配列
- (3)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドからなる塩基配列
- (4)配列番号:1または2に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドからなる塩基配列
- [22] 第二のポリヌクレオチドが、少なくとも15塩基長を有する、請求項21記載の試薬。
- [23] 以下の(1)～(3)の工程を含む、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を製造する方法。
- (1)請求項18または19に記載の方法によりドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する工程、
- (2)工程(1)において選択された細胞を培養する工程、
- (3)工程(2)において培養された細胞から分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程
- [24] 以下の(1)～(2)の工程を含む、ドーパミン産生ニューロンを製造する方法。
- (1)請求項18または19に記載の方法によりドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する工程、
- (2)工程(1)において選択された細胞を培養する工程
- [25] (3)工程(2)において培養された細胞からドーパミン産生ニューロンを選択する工程をさらに含む、請求項24に記載の方法。
- [26] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を検出または選択する方法であって、以下の(1)

～(4)のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドと結合する抗体を、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞試料に接触させる工程を含む方法。

(1)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列

(2)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列

(3)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加され、またはそれらの組合せにより変異されたアミノ酸配列

(4)配列番号:1または2に記載の塩基配列に相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドからなるアミノ酸配列

[27] 一部配列からなるポリペプチドが、少なくとも連続した6アミノ酸残基を有する、請求項26に記載の方法。

[28] 請求項26または27に記載の方法により選択されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞集団。

[29] 細胞全体のうち、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を40%以上含むことを特徴とする、請求項28に記載の細胞集団。

[30] 以下の(1)～(4)のいずれかに記載のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドと結合する抗体を有効成分として含有する、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を識別するための試薬。

(1)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列

(2)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列

(3)配列番号:3または4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加され、またはそれらの組合せにより変異されたアミノ酸配列

(4)配列番号:1または2に記載の塩基配列に相補的な配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドからなるアミノ酸配列

- [31] 一部配列からなるポリペプチドが、少なくとも連続した6アミノ酸残基を有する、請求項30に記載の試薬。
- [32] 抗体が、ハイブリドーマ(FERM BP-10315またはFERM BP-10316)により産生される抗体である、請求項30に記載の試薬。
- [33] ハイブリドーマ(FERM BP-10315またはFERM BP-10316)により産生される抗体。
- [34] 以下の(1)～(2)の工程を含む、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を製造する方法。
- (1)請求項26または27に記載の方法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程、
- (2)分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を除去して、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する工程
- [35] 以下の(1)～(2)の工程を含む、分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を製造する方法。
- (1)請求項26または27に記載の方法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程、
- (2)工程(1)において選択された細胞を培養する工程
- [36] (3)工程(2)において培養された細胞から分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程
- をさらに含む、請求項35に記載の方法。
- [37] 以下の(1)～(2)の工程を含む、ドーパミン産生ニューロンを製造する方法。
- (1)請求項26または27に記載の方法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程、
- (2)工程(1)において選択された細胞を培養する工程、
- [38] (3)工程(2)において培養された細胞からドーパミン産生ニューロンを選択する工程
- をさらに含む、請求項37に記載の方法。
- [39] 以下の細胞からなる群から選択される少なくとも一つの細胞を含む、神経変性疾患を治療するためのキット。
- (1)請求項20に記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞集団

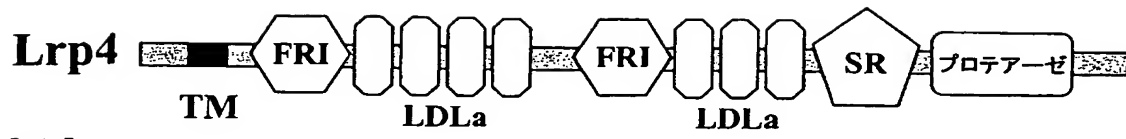
- (2) 請求項23に記載の方法により製造された分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞
- (3) 請求項24に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
- (4) 請求項25に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
- (5) 請求項28に記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞集団
- (6) 請求項29に記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞集団
- (7) 請求項34に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞
- (8) 請求項35に記載の方法により製造された分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞
- (9) 請求項36に記載の方法により製造された分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞
- (10) 請求項37に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
- (11) 請求項38に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
- [40] 神経変性疾患が、パーキンソン病である、請求項39に記載のキット。
- [41] 以下の細胞からなる群から選択される少なくとも一つの細胞を患者の脳内に移植することを特徴とする、神経変性疾患の治療方法。
 - (1) 請求項20に記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞集団
 - (2) 請求項23に記載の方法により製造された分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞
 - (3) 請求項24に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
 - (4) 請求項25に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
 - (5) 請求項28に記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞集団
 - (6) 請求項29に記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞集団
 - (7) 請求項34に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞
 - (8) 請求項35に記載の方法により製造された分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞

- (9)請求項36に記載の方法により製造された分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞
- (10)請求項37に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
- (11)請求項38に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
- [42] 神経変性疾患が、パーキンソン病である、請求項41に記載の方法。
- [43] 神経変性疾患を治療するためのキットを製造するための以下の細胞からなる群から選択される少なくとも一つの細胞の使用。
 - (1)請求項20に記載のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞集団
 - (2)請求項23に記載の方法により製造された分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞
 - (3)請求項24に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
 - (4)請求項25に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
 - (5)請求項28に記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞集団
 - (6)請求項29に記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞集団
 - (7)請求項34に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞
 - (8)請求項35に記載の方法により製造された分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞
 - (9)請求項36に記載の方法により製造された分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞
 - (10)請求項37に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
 - (11)請求項38に記載の方法により製造されたドーパミン産生ニューロン
- [44] 神経変性疾患が、パーキンソン病である、請求項43に記載の使用。

要 約 書

本発明は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を効率的に分離することを可能にする、Lrp4/Corinドーパミン産生ニューロン前駆細胞マーカーを検出するためのポリヌクレオチドプローブ及び抗体、並びに、それらを用いた前駆細胞の選択方法に関する。細胞における該Lrp4の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となる。

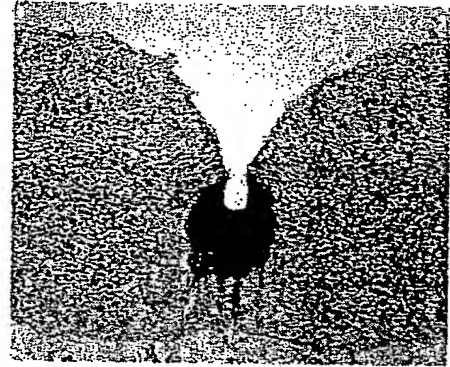
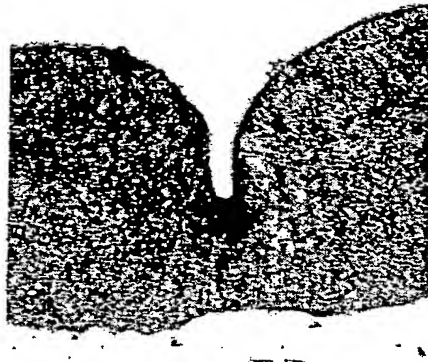
[図1]



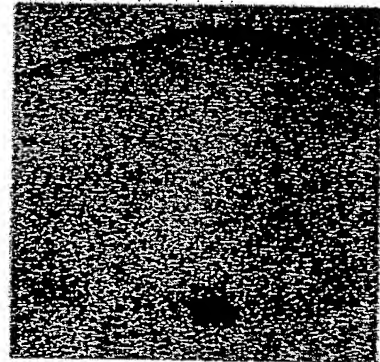
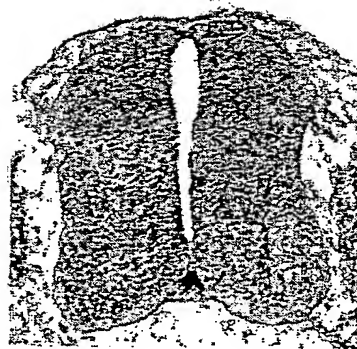
[図2]

Lrp4**Shh**

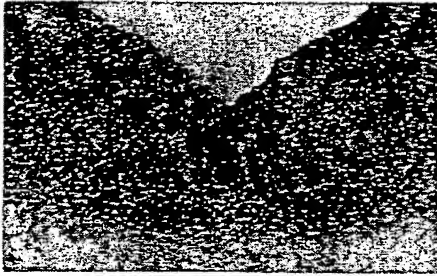
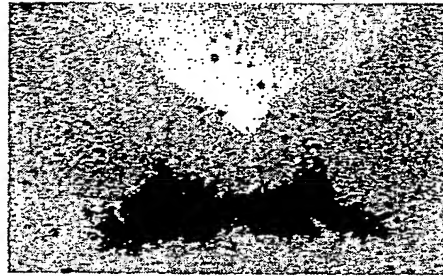
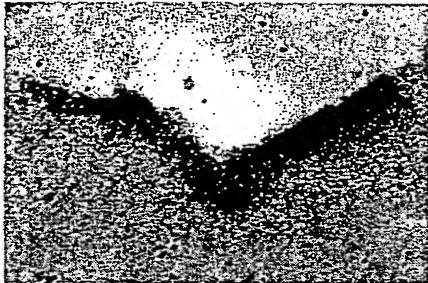
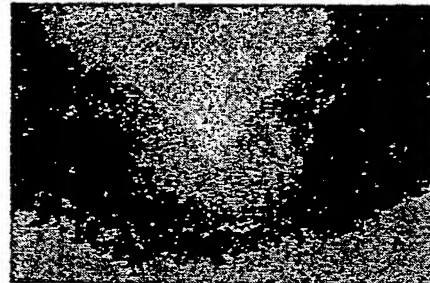
後脳



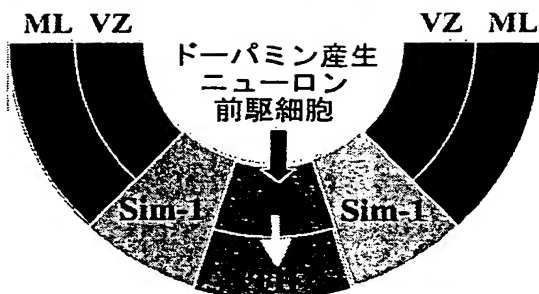
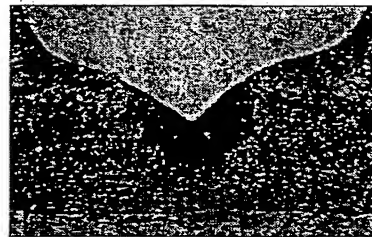
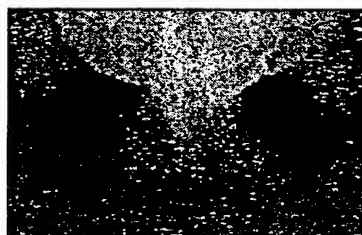
脊髄



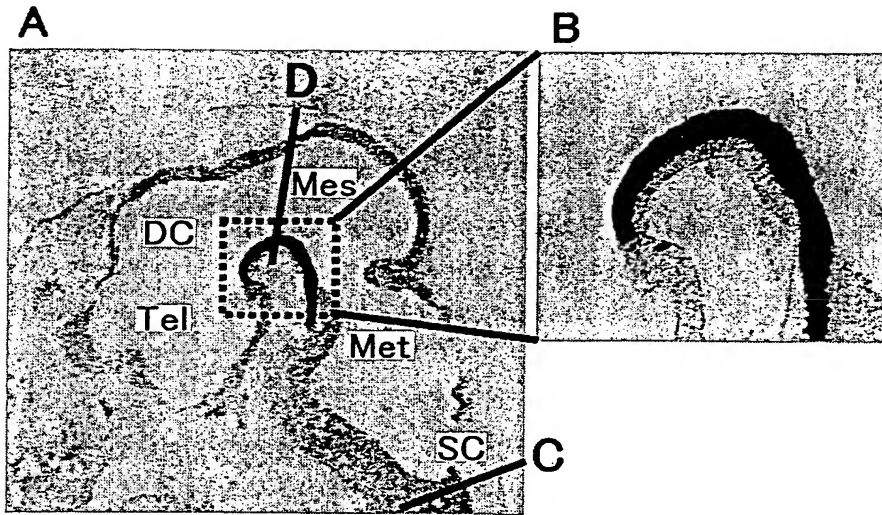
[図3]

Lrp4**TH****Shh****NCAM**

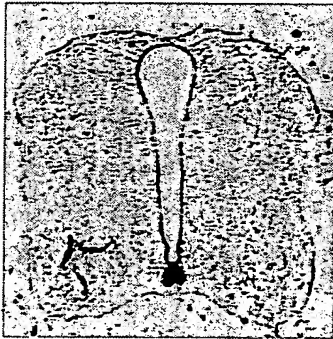
[図4]

**Lrp4****TH****Sim-1****NCAM**

[図5]

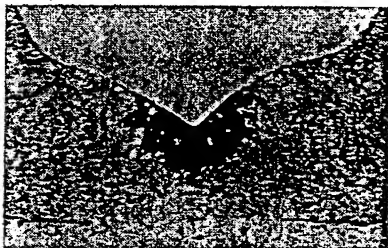


C. 脊髓

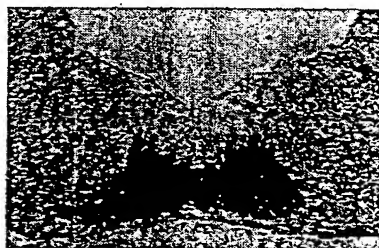


D. 中脳

Lrp4



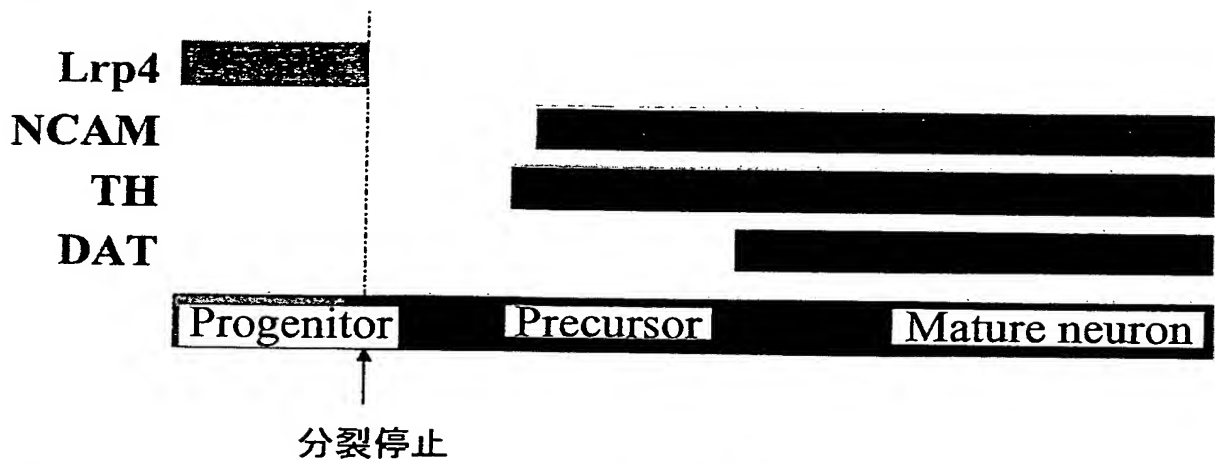
TH



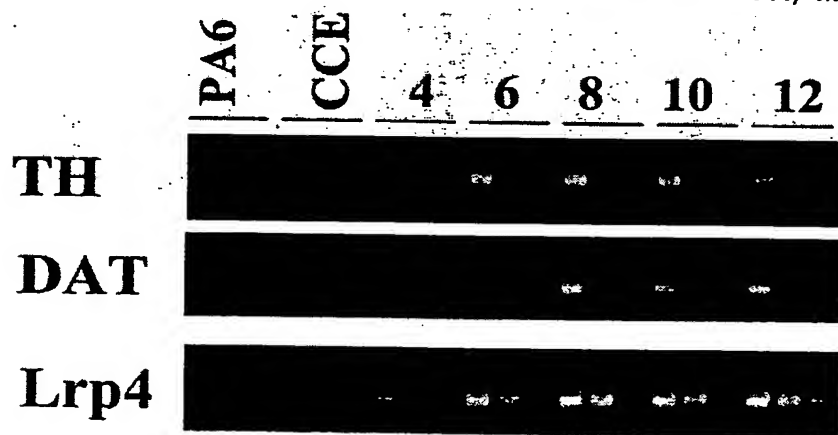
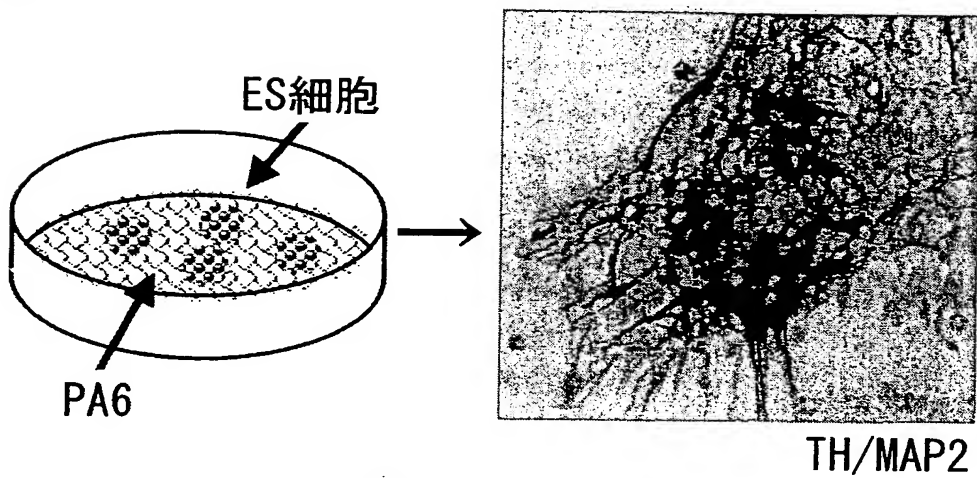
Shh



[図6]

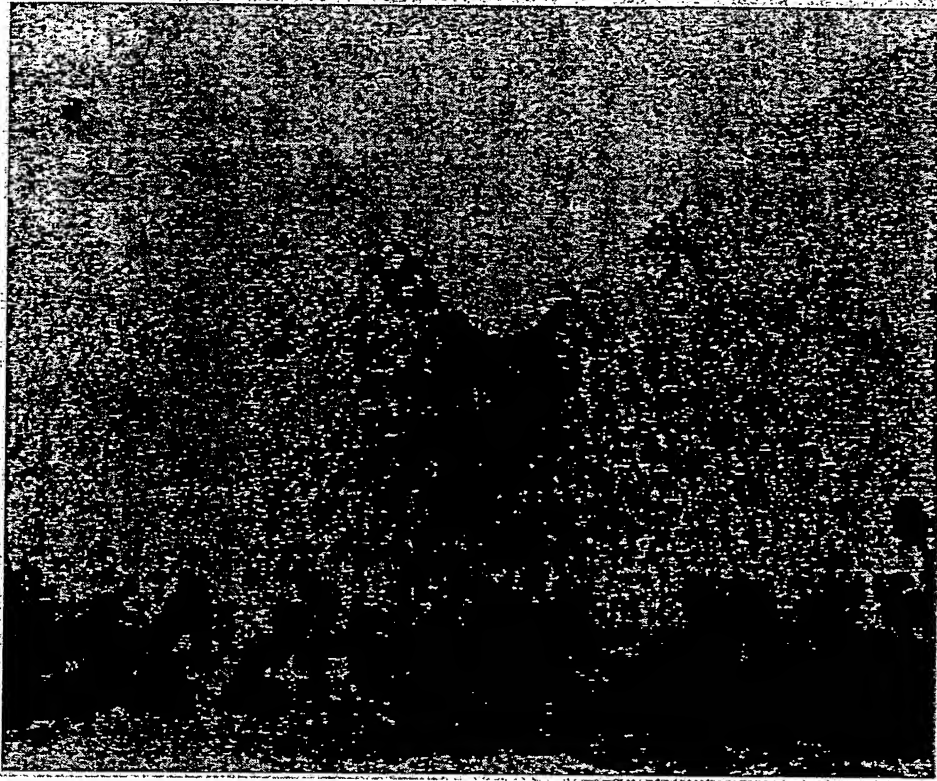


[図7]

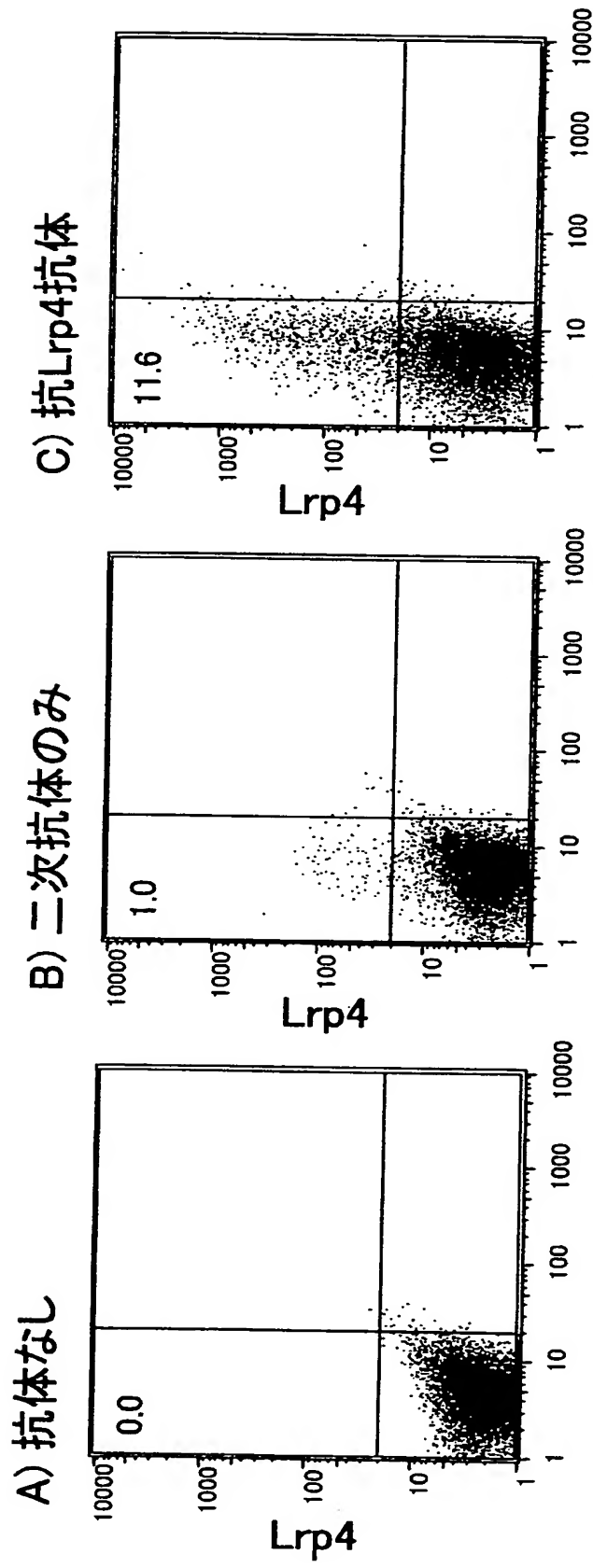


[図8]

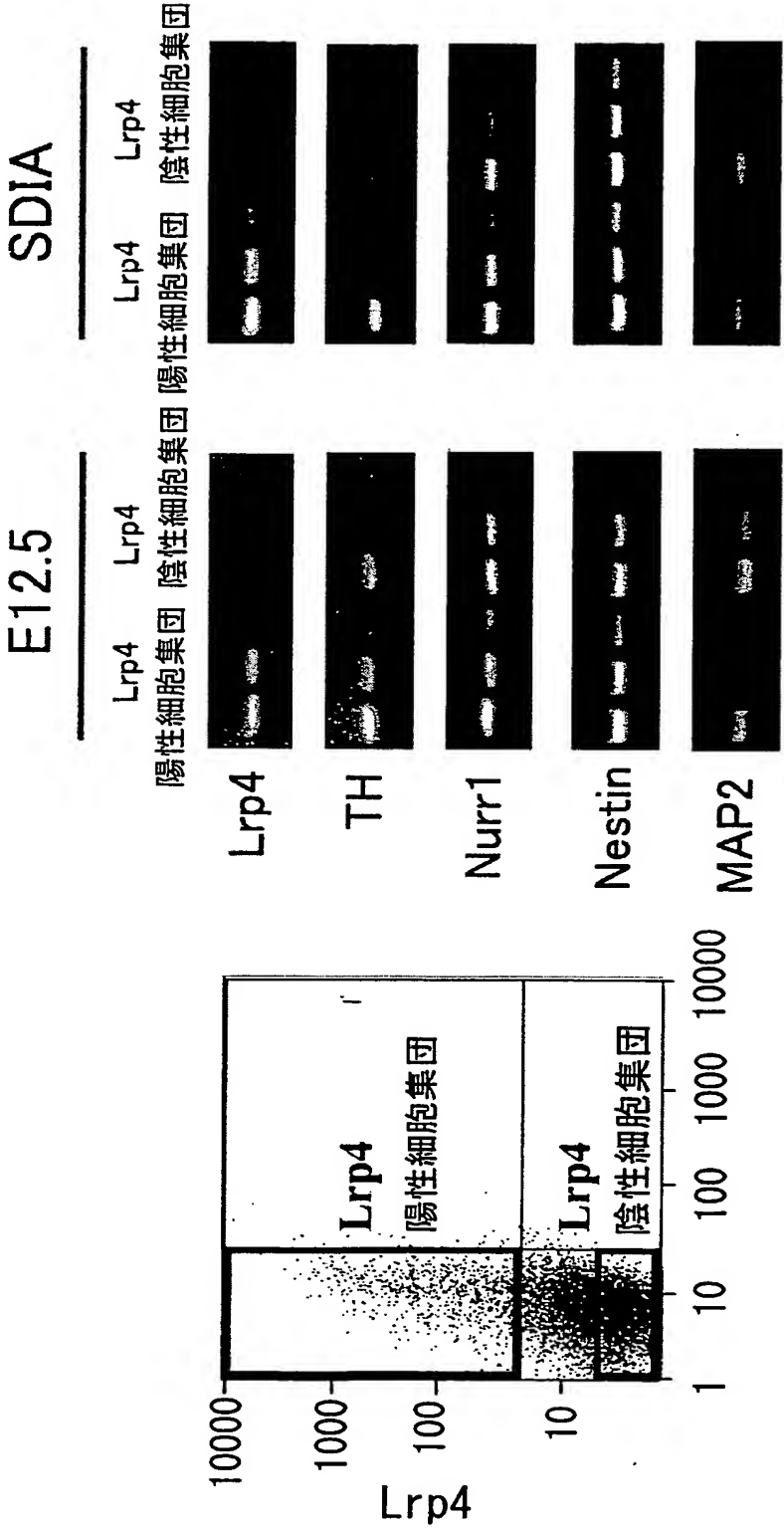
Lrp4/TH



[図9]



[図10]



[図11]

Lrp4 mRNA

Lrp4 protein

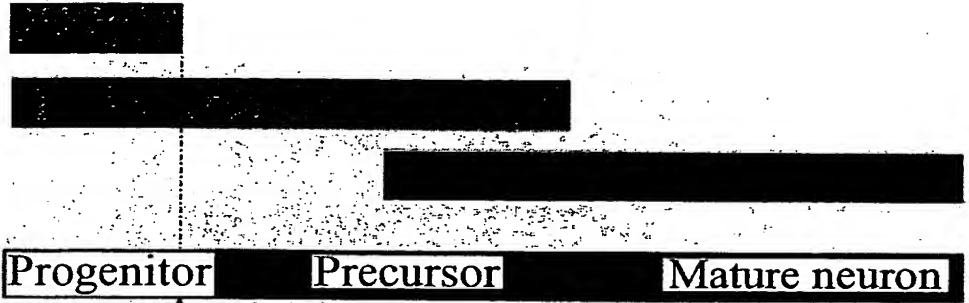
TH mRNA

Progenitor

Precursor

Mature neuron

分裂停止

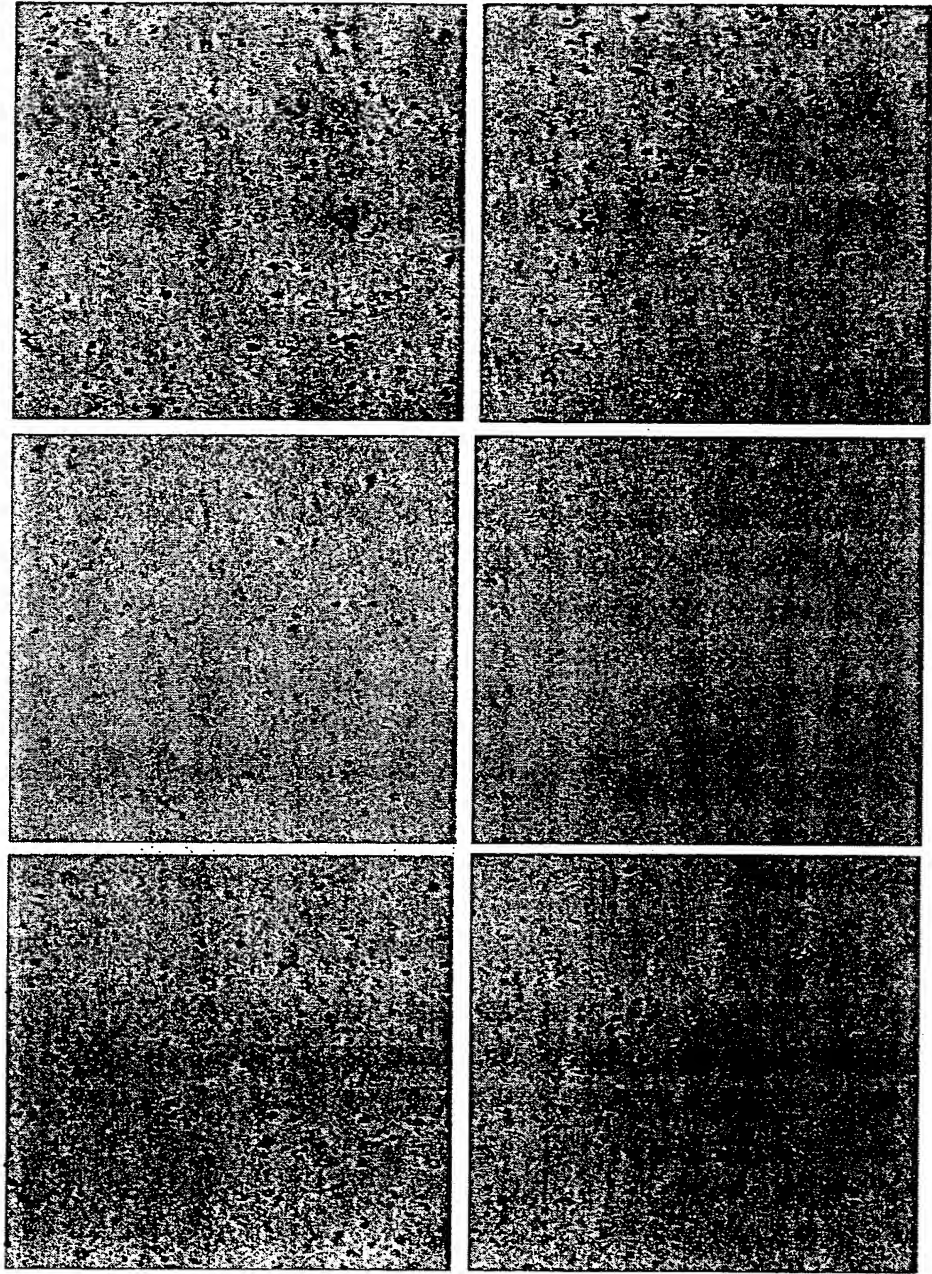


[図12]

重ね合わせ

β III-tubulin

Nestin

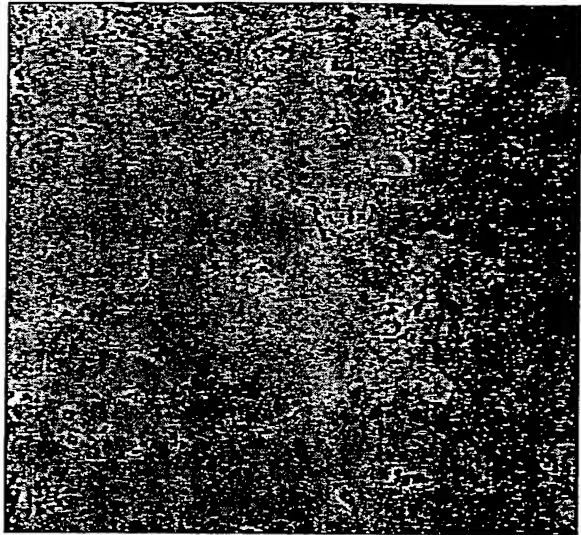


対照

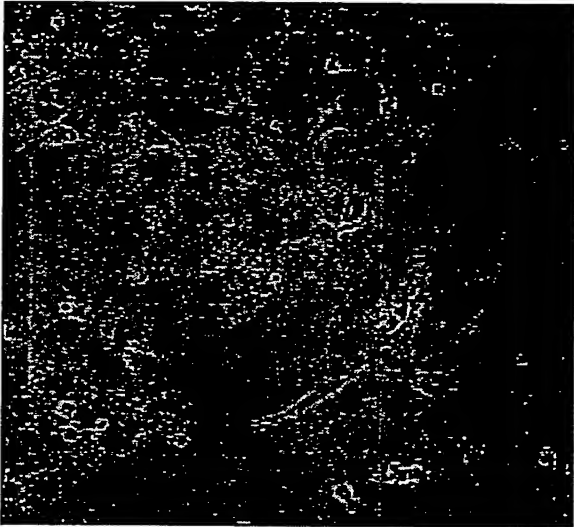
Lrp4 Abで
分離した細胞

[図13]

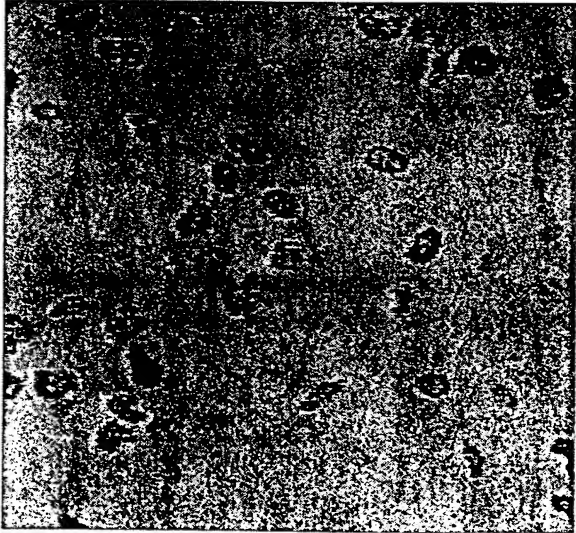
重ね合わせ



透過



BrdU



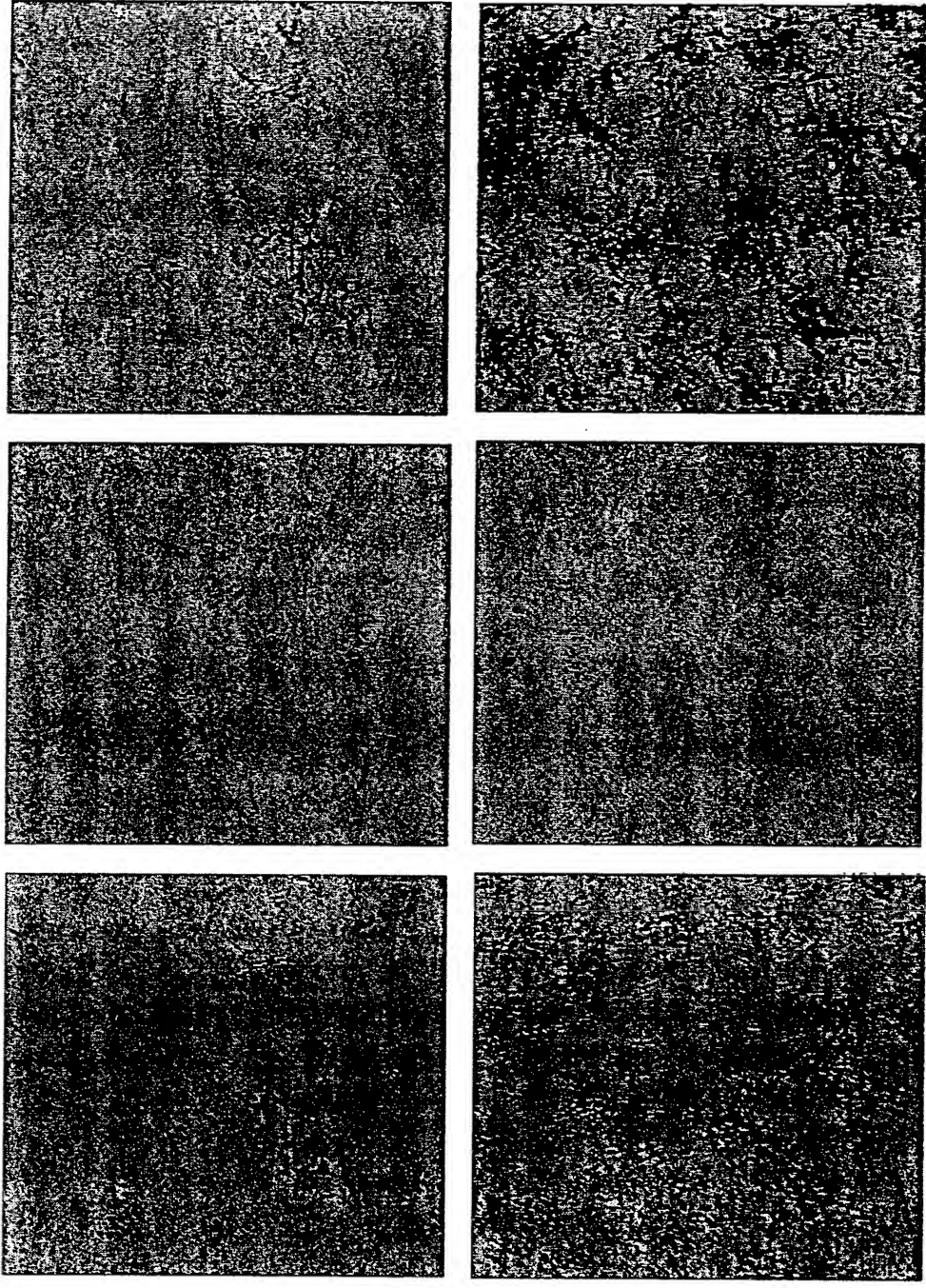
培養：18時間

[図14]

重ね合わせ

β III-tubulin

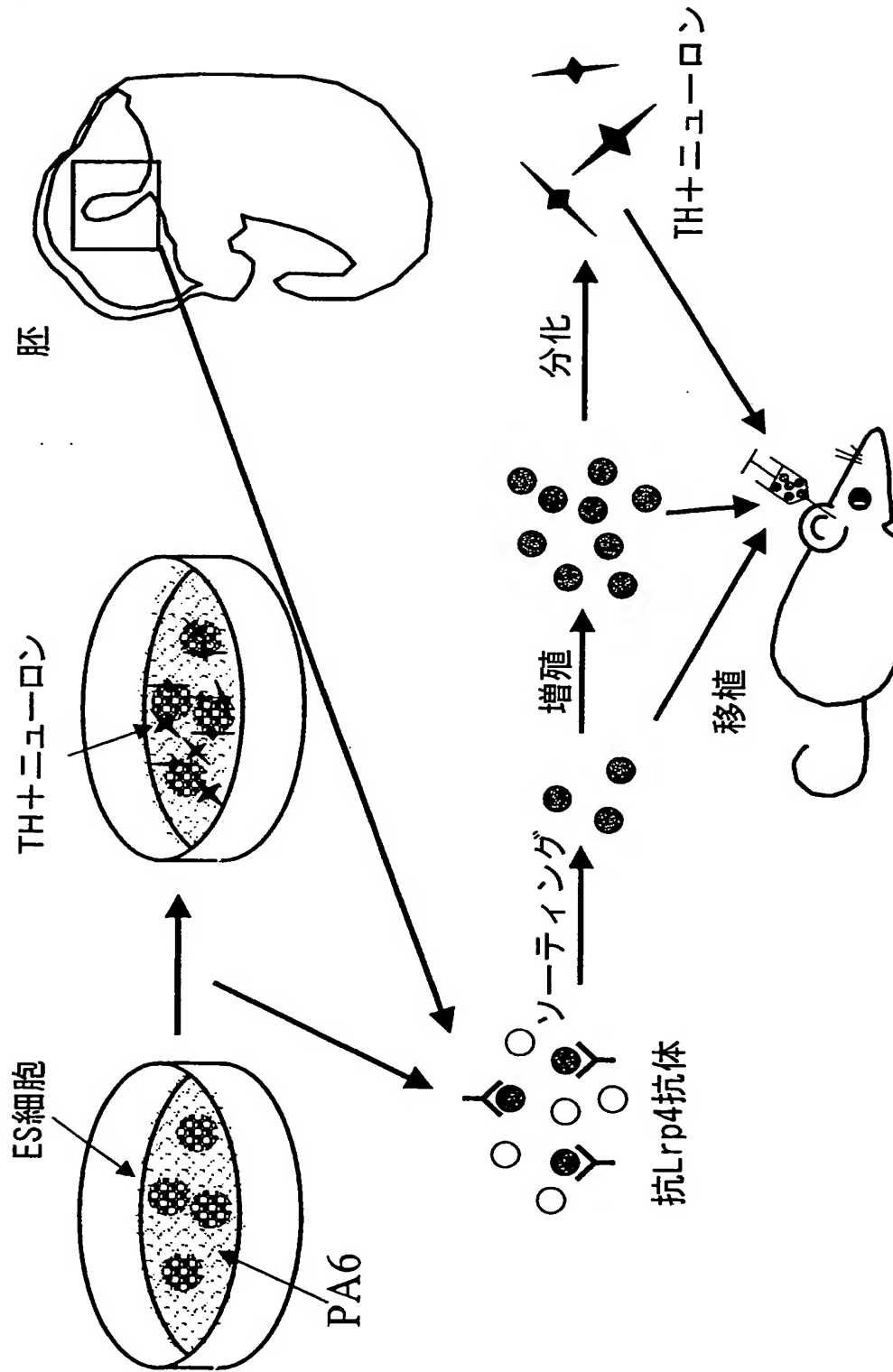
TH



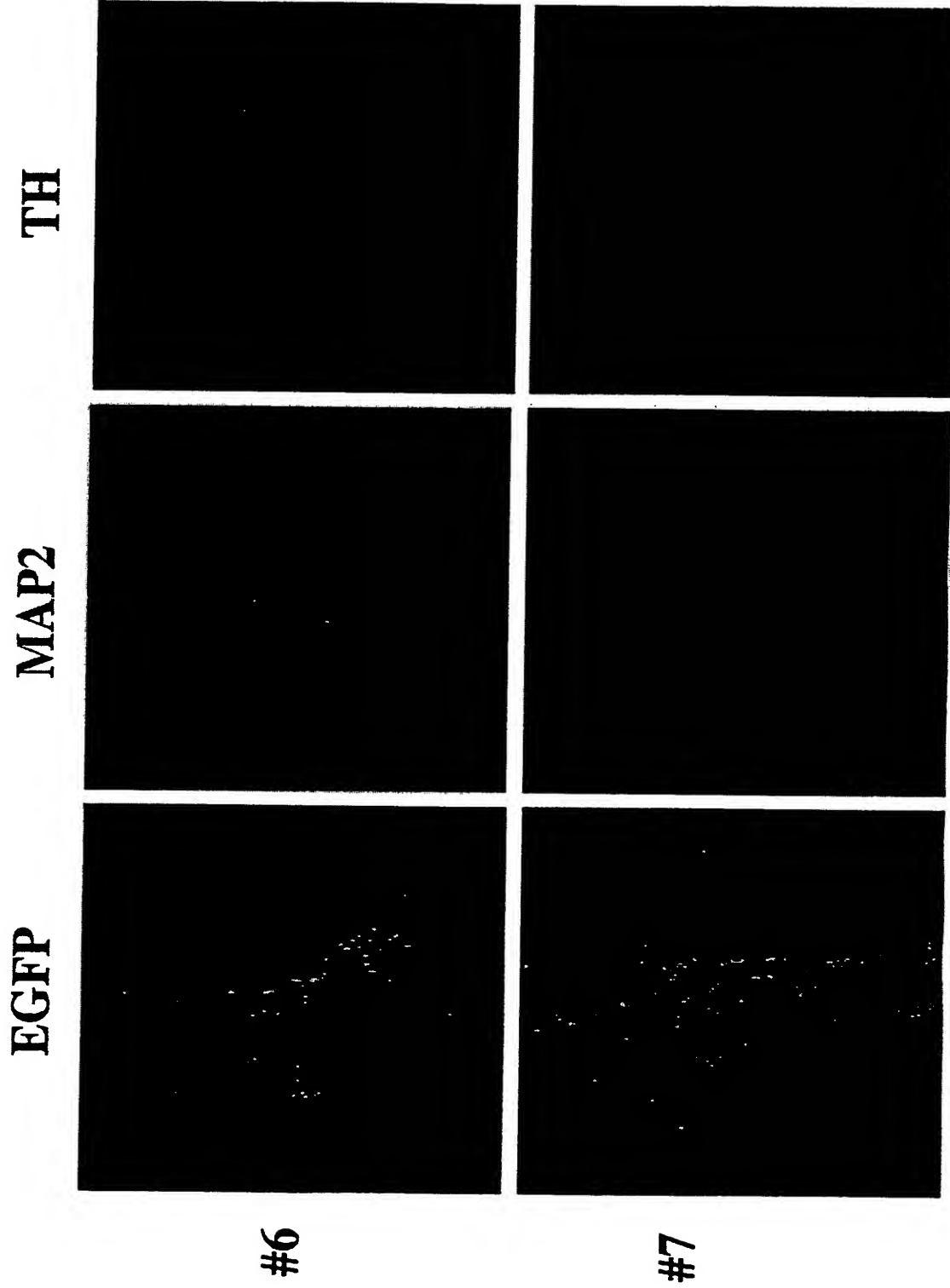
対照

Lrp4 Abで
分離した細胞

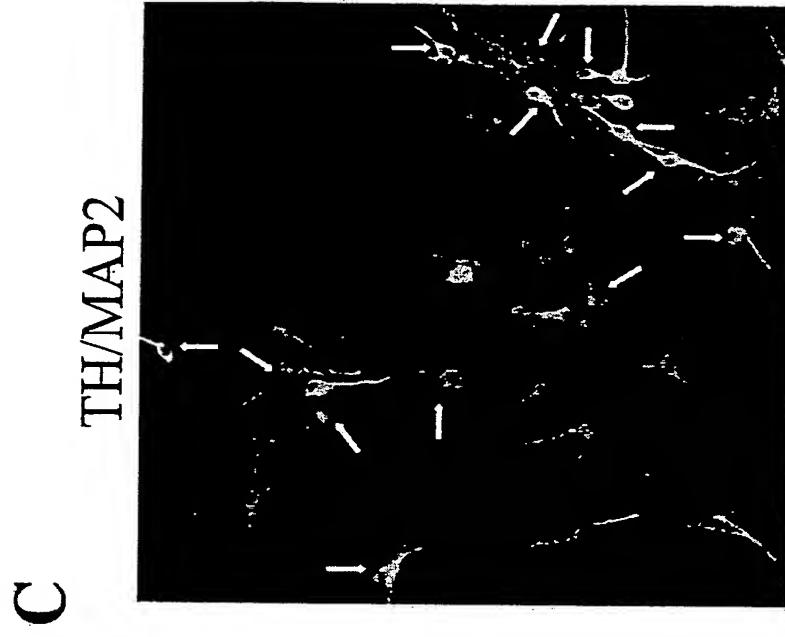
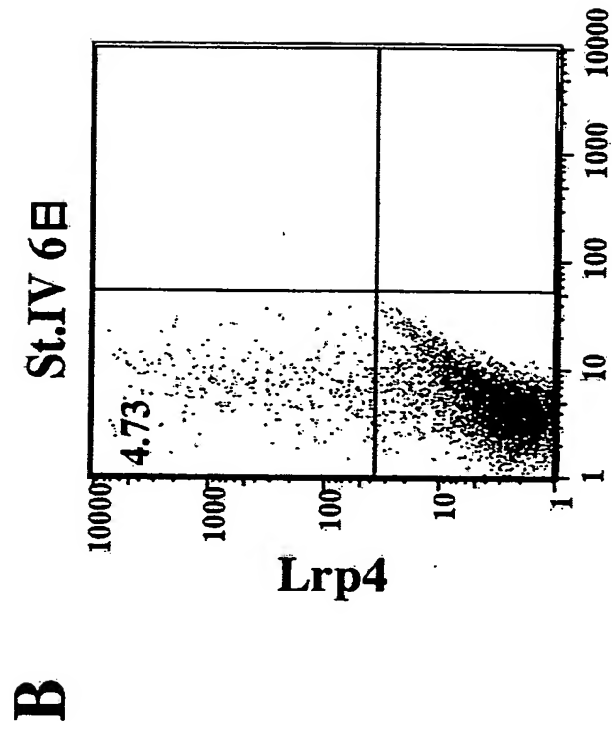
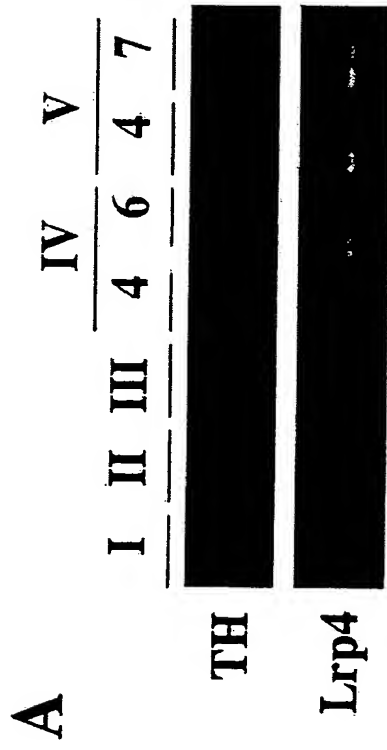
[図15]



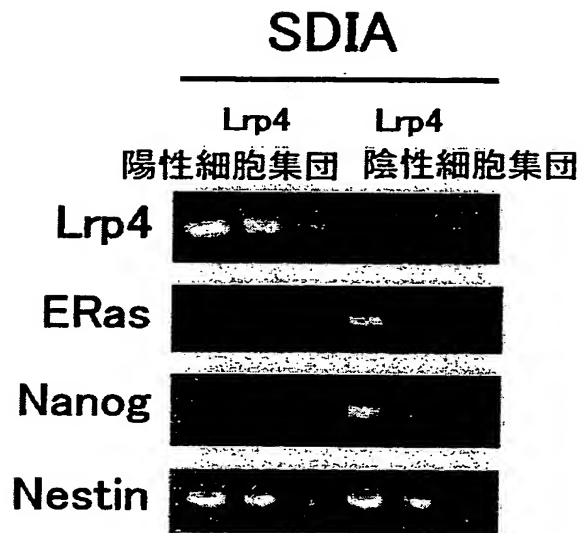
[図16]



[図17]



[図18]



1

SEQUENCE LISTING

<110> EISAI CO., LTD.

<120> Dopaminergic neuronal progenitor marker Lrp4/Corin

<130> E4-A0404Y1P

<150> JP 2004-213743

<151> 2004-07-22

<150> JP 2004-315060

<151> 2004-10-29

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4864

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

```
ctagtcccca ggcagacggt ccctcactcc tgtggcttgg cgtcggagac gctggcagtc    60
atgggcaggg ttctcttcag cgttcgggtc agctccgtgc ggagagcccg ctgctcttgt    120
cctgggcgat gctacctctc ctgcagagtc cctccaacca ccgccctccg tgactgaac    180
ggtcttggct gcgcgggggt tccgggggag actgcaggtg gagccgtcgg acccggcccc    240
ttggggaccc gtggcttcct ctccgggtcc aagtccagg ctcccggcag ctggaaggat    300
tgctttggag cccgcctgc tccagacgtc ttgagagcag acaggagcgt gggcgagggc    360
tgtctcaga agctggtgac tgctaacttg ctgcgcttcc tcctgctggt gtcctatccc    420
tgcatctgcg ccctcatcgt gctgctggcc atcctgctgt cctttgtggg aacattaaaa    480
agggttiatt tcaaatcaaa tgacagtga cctttggtca ctgatgggga agctcgagt    540
cctggtgtta ttctgtaaa tacagtttat tatgagaaca caggggcgcc ctctctgccc    600
cccagccagt ccactccagc ctggacaccg agagctcctt ctccagagga ccagagtcac    660
aggaacacaa gcacctgcat gaacatcact cacagccagt gtcaaattct gccctaccac    720
```

agcacgttgg cacctctctt gccaatgtgc aaaaacatgg acatggagaa gttcctcaag 780
 ttcttcacgt acctccatcg cctcagttgc tatcaacata tcctgctctt cggctgtagc 840
 ctgccttcc ctgagtgcgt tgttgatggc gatgacaggc atggctcttct accctgtaga 900
 tctttctgtg aggctgcaaa agaaggatgc gaatctgtcc tgggaatggt gaactcctcc 960
 tggccggatt ccctcagatg ctctcagttt agggaccaca ctgagactaa cagcagtgtc 1020
 agaaagagct gcttctcact gcagcaggaa catggaaagc aatcactctg tggagggggc 1080
 gagagcttcc tgtgtaccag cgggctctgc gtccccaaga agctgcagtg taacggctat 1140
 aatgactgtg atgactggag cgacgaggcg cattgcaact gcagcaagga tctgtttcac 1200
 tgtggcacag gcaagtgcct ccactacagc ctcttgtgtg atgggtacga tgactgtggg 1260
 gacccgagtg acgagcaaaa ctgtgattgt aatctcacia aagagcatcg ctgtggagat 1320
 gggcgctgca ttgcggctga gtgggtgtgc gatggggacc atgactgtgt ggacaagtct 1380
 gatgaggcca actgctcttg tcacagccag ggcttggtgg aatgcacaag tggacagtgc 1440
 atccctagca ccttcagtg tgatggggac gaagactgta aggatgggag tgacgaggag 1500
 aactgcagtg acagtacagc gccatgtcca gaaggagaac agggatgctt tggcagttcc 1560
 tgcgtcgaat cctgtgctgg tagctctctg tgtgactcag acagcagcct gagtaactgc 1620
 agtcaatgtg agcccatcac tttggaactc tgcataaatt tgctctacaa ccatacacat 1680
 tatccaaatt accttggcca cagaactcaa aaggaagcgt ccatcagctg ggagtcatcc 1740
 cttttccctg cccttgatca aaccaactgt tacaataacc tcatgttttt cgcttgaccc 1800
 attttgggtc caaagtgtga tgtgaatata ggacaacgca tcccgcttg cagactcctg 1860
 tgtgagcact ccaaagagcg ctgtgagtct gttctgggaa tcgttggcct gcagtggcct 1920
 gaagacaccg actgcaatca atttccagag gaaagttcag acaatcaaac ttgcctcctg 1980
 cccaatgaag atgtggaaga atgctctccg agtcacttca aatgccgctc gggacgatgc 2040
 gttctgggct ccaggagatg tgacggccag gctgactgtg acgacgacag tgacgaggag 2100
 aactgtggtt gtaaagagag agctcttttg gaatgtccat ttaataagca atgtctgaag 2160

catacattaa tctgcgatgg gtttccagat tgtccagaca gtatggatga aaaaaactgc 2220
 tcattttgcc aagacaatga gctggaatgt gccaaccatg agtgtgtgcc gcgtgacctt 2280
 tgggtgcgacg gatgggtcga ctgctcagac agttctgatg aatggggctg tgtgaccctc 2340
 tctaaaaatg ggaactcctc ctcatctgtg actgttcaca aatctgcaaa ggaacaccac 2400
 gtgtgtgctg acggctggcg ggagacgttg agtcagctgg cctgcaagca gatgggttta 2460
 ggagaaccgt ctgtgaccaa gctgatccca ggacaggaag gccagcagtg gctgaggttg 2520
 taccccaact gggagaatct caatgggagc accttgacagg agctgctggt atacaggcac 2580
 tcctgcccac gcagaagtga gatttccctt ctgtgctcca agcaagactg tggccgccgc 2640
 cctgctgccc gaatgaacaa gaggatcctt gggggctcga ctagtctcc tgggaggtgg 2700
 ccgtggcagt gctctctgca gagtgaaccc agtggacata tctgtggctg tgcctcatt 2760
 gccaaagaat gggctcctgac agttgcccac tgccttgaag ggagagaaga cgctgatgtt 2820
 tggaaagtgg tatttggcat aaacaacctg gaccatccat caggcttcat gcagacccgc 2880
 ttgtgaaga ccatcctgct acatccccgt tacagtcgag cagtggtaga ctatgatatc 2940
 agcgtgggtg agctgagcga tgatatcaat gagacaagct acgtcagacc tgtctgccta 3000
 ccagtcctgg aggagtatct agaaccagat acgtactgct acatcacagg ctggggccac 3060
 atgggcaata aaatgccctt taagctgcag gagggagagg tccgcattat ccctctggag 3120
 cagtgccagt cctattttga catgaagacc atcaccaatc ggatgatctg tgctggctat 3180
 gagtctggca ccgtggactc ctgcatggga gacagcggtg ggcctctggt ttgtgaacga 3240
 cccggaggac agtggacatt atttggttta acttcatggg gctccgtctg cttttccaaa 3300
 gttctgggac ctggagtgtc cagcaatgtg tcttactttg tgggctggat tgaaagacaa 3360
 atatatatcc agacctttct ccaaaagaaa tccaaggat aatcagagac tttgtgggga 3420
 aacctacatg gagaatgacc ctctgaaaca gaagcttgtc ctgccaagag ctgtacgaac 3480
 aggcgtttca cggacaggac gctcaacatg caccgcaaga tctctctgt ttgtgctaga 3540
 tgagttttac tcaggcttta atctctttca acattatcat ttattaattt catgaatcct 3600

tttaaaagca cagagcaaag taggttttgt tattttgcta ggctaacctt gaatgtagtg 3660
 tgcaattacc aacctataga gacatttgga gctctagggt aacaagtat agaaagctcc 3720
 ttttattact actacaagac acacacggag atacacgctg actgatctcc agtttctgct 3780
 taagcccagt ggcttagggg gcacatttca gaactgatct tggagactgg cttttaattt 3840
 gtagaaagcc aagagaatat atatgctttt attatttact ctactcttct aaataacttg 3900
 aagaaatcat gaaagacaga gaaaggaccc acagtgttga tctagacagt tgaagttgca 3960
 agaatgtaaa attctctagc caaccaaact aacactctga agtaagtaga attctatcct 4020
 ttctgtattc aaattaagct taaaatctcc accagatttg ttcccgttac tgggaatttt 4080
 cggagtatgt cacttagatg actgtgatgt caaaagccag gtcaatcctt gaggaaataa 4140
 ttgttttgc tttgtgggaa tgaataagaa tctttccatt ccgcaaaaca cacaattaa 4200
 aaaggagaaa aaaaattaaa taacattcca caccaatta attctgaaaa ttagtctgct 4260
 tgtattcacc caaacagaa aagttacaga aatatatttc aaagtgcagc aaaatgttgc 4320
 atggagtata taacattttg caatttcccc ctcatgatgt ctaacatccg gtattgccat 4380
 ttgcctcatt gataattaaa actaaatttt aaggatgctt ttaagcactg ggccacttta 4440
 tgggaatcaa ttccaaagc aattagtgtg tacaagtatt tttccact aaaaagtttc 4500
 aaaacacaaa cttcatact aaattaatta gccagacatg aactatgtaa catgcaaatg 4560
 cctttttgaa caagtaggat gcactgttaa acttcaccag caaccaaact gcctcagtat 4620
 tgcttacagg gactacctgc aattttatat gtgtattttg tactcttttt ctagatagtt 4680
 caaatgcaaa acattgtttc aaccctatt ctccatgttg ttcacctctt gtccctggaat 4740
 ttgttacaaa gtgtgtgtag caaatgattg tactgcggtc aggactatat gaaggtttag 4800
 gaccatcggg tcggttttgt tataattgtt ggcacataat taataaaata tttttagcat 4860
 tggg 4864

<210> 2
 <211> 5810
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cgggcccagg cgcggtggcg gtggccgggg ctgcggcgcg gggggcgggg cggtcggggc	60
cgggacaccc cctcccggtc ccctggcggg gcagcgtcgg ctctggcagc actggaggcg	120
gcggcggccc gagggcgact tgcggggcgc gcaggccgcc gtgcaccggg gacgcttccc	180
cctcggggac cctcccgagg cttctccgcc gcgccgtccg gcgggagccg gcgggacccc	240
gggcgagcgg cgcgggcggc accatgaggc ggagtgggg cgcgctgctg cttggcgccc	300
tgctctgcgc acacgtacta cctacctgtt cccctcttga ctttactgt gacaatggca	360
agtgcacccg ccgctcctgg gtgtgtgacg gggacaacga ctgtgaggat gactcggatg	420
agcaggactg tcccccccg gagtgtagg aggacgagtt tccctgccag aatggctact	480
gcatccggag tctgtggcac tgcgatggtg acaatgactg tggcgacaac agcgtatgagc	540
agtgtgacat gcgcaagtgc tccgacaagg agttccgctg tagtgacgga agctgcattg	600
ctgagcattg gtactgcgac ggtgacaccg actgcaaaga tggtccgat gaggagaact	660
gtccctcagc agtgccagcg cccccctgca acctggagga gttccagtgt gcctatggac	720
gctgcatcct cgacatctac cactgcgatg gcgacgatga ctgtggagac tggtcagacg	780
agtctgactg ctgtgagtac tctggccagc tgggagcctc ccaccagccc tgccgctctg	840
gggagttcat gtgtgacagt ggccgtgtgca tcaatgcagg ctggcgctgc gatggtgacg	900
cggactgtga tgaccagtct gatgagcgca actgcaaaca gttccgctgt cactcaggcc	960
gctgtgtccg cctgtcctgg cgctgtgatg gggaggacga ctgtgcagac aacagcgatg	1020
aagagaactg tgagaataca ggaagcccc aatgtgcctt ggaccagttc ctgtgttgga	1080
atgggcgctg catitggcag aggaagctgt gcaacggggt caacgactgt ggtgacaaca	1140
gcgacgaaag cccacagcag aattgccggc cccggacggg tgaggagaac tgcaatgtta	1200
acaacggtgg ctgtgccag aagtgccaga tggtcgggg ggacgtgcag tgtacctgcc	1260
acacaggcta cggctcaca gaggatgggc acacgtgcca agatgtgaat gaatgtgccg	1320
aggaggggta ttgcagccag ggctgcacca acagcgaagg ggctttccaa tgctggtgtg	1380

aaacaggcta tgaactacgg cccgaccggc gcagctgcaa ggctctgggg ccagagcctg 1440
 tgctgtgtt cgccaatcgc atcgacatcc ggcaggtgct gccacaccgc tctgagtaca 1500
 cactgtgtgt taacaacctg gagaatgcca ttgcccttga tttccaccac cgccgcgagc 1560
 ttgtcttctg gtcagatgtc accctggacc ggatcctccg tgccaacctc aacggcagca 1620
 acgtggagga ggttgtgtct actgggctgg agagcccagg gggcctggct gtggattggg 1680
 tccatgacaa actctactgg accgactcag gcacctcgag gattgaggtg gccaatctgg 1740
 atggggccca ccggaaagtg ttgctgtggc agaacctgga gaagccccgg gccattgcct 1800
 tgcatcccat ggaggggtacc atttactgga cagactgggg caacaccccc cgtattgagg 1860
 cctccagcat ggatggctct ggacgccga tcattgccga taccatctc ttctggccca 1920
 atggcctcac catcgactat gccggggccc gtatgtactg ggtggatgct aagcaccatg 1980
 tcatcgagag ggccaatctg gatgggagtc accgtaaggc tgtcattagc cagggttttg 2040
 aagacagcct gtactggaca gactggcaca ccaagagcat caatagcgct aacaaattta 2100
 cggggaagaa ccaggaaatc attcgcaaca aactccactt ccctatggac atccacacct 2160
 tgcaccccca gcgccaacct gcagggaaaa accgctgttg ggacaacaac ggaggctgca 2220
 cgcacctgtg tctgcccagt ggccagaact acacctgtgc ctgccccact ggcttccgca 2280
 agatcagcag ccacgcctgt gccagagtc ttgacaagtt cctgcttttt gcccgaggga 2340
 tggacatccg tcgaatcagc ttgacacag aggacctgtc tgatgatgtc atcccactgg 2400
 ctgacgtgcg cagtgtgtg gcccttgact gggactcccc ggatgaccac gtgtactgga 2460
 cagatgtcag cactgatacc atcagcaggg ccaagtggga tggaacagga caggaggtgg 2520
 tagtggatac cagtttgag agcccagctg gcctggccat tgattgggtc accaacaac 2580
 tgtactggac agatgcaggt acagaccgga ttgaagtagc caacacagat ggcagcatga 2640
 gaacagtact catctgggag aaccttgatc gtctcggga catcgtggtg gaacccatgg 2700
 gcgggtacat gtattggact gactggggtg cgagcccaa gattgaacga gctggcatgg 2760
 atgcctcagg ccgccaagtc attatctctt ctaatctgac ctggcctaata gggttagcta 2820

ttgattatgg gtcccagcgt ctatactggg ctgacgccgg catgaagaca attgaatttg	2880
ctggactgga tggcagtaag aggaagggtc tgattggaag ccagctcccc caccatttg	2940
ggctgaccct ctatggagag cgcattctatt ggactgactg gcagaccaag agcatacaga	3000
gcgctgaccg gctgacaggg ctggaccggg agactctgca ggagaacctg gaaaacctaa	3060
tggacatcca tgtcttcac cgccgccggc cccagtgtc tacacatgt gctatggaga	3120
atggcggctg tagccacctg tgtcttaggt ccccaaatcc aagcggattc agctgtacct	3180
gccccacagg catcaacctg ctgtctgatg gcaagacctg ctcaccaggc atgaacagtt	3240
tcctcatctt cgccaggagg atagacattc gcatggcttc cctggacatc cctattttg	3300
ctgatgtggt ggtaccaatc aacattacca tgaagaacac cattgccatt ggagtagacc	3360
cccaggaagg aaaggtgtac tggctgaca gcacactgca caggatcagt cgtgccaatc	3420
tggatggctc acagcatgag gacatcatca ccacagggtc acagaccaca gatgggctcg	3480
cggttgatgc cattggccgg aaagtatact ggacagacac gggaacaaac cggattgaag	3540
tgggcaacct ggacgggtcc atgcggaaag tgttggtgtg gcagaacctt gacagtcccc	3600
gggccatcgt actgtacat gagatggggt ttatgtactg gacagactgg ggggagaatg	3660
ccaagttaga gcggtccgga atggatggct cagaccgcgc ggtgctcatc aacaacaacc	3720
taggatggcc caatggactg actgtggaca aggccagctc ccaactgcta tgggccgatg	3780
cccacaccga gcgaattgag gctgctgacc tgaatggtgc caatcggcat acattggtgt	3840
caccggtgca gcacccatat ggccctaccc tgctcgactc ctatatctac tggactgact	3900
ggcagactcg gagcatccac cgtgctgaca agggctactg cagcaatgtc atcctcgtga	3960
ggtccaacct gccaggcctc atggacatgc aggtgtgga ccgggcacag ccactaggtt	4020
ttaacaagtg cggctcgaga aatggcggct gctccacct ctgcttgccct cggccttctg	4080
gcttctctg tgccctcccc actggcatcc agctgaagg agatgggaag acctgtgatc	4140
cctctctga gaacctctg ctcttctcca gccgtggctc catccggcgt atctcactgg	4200
acaccagtga ccacaccgat gtgcatgtcc ctgttctga gctcaacaat gtcattcccc	4260

tggactatga cagcgtggat ggaaaggctt attacacaga tgtgttcctg gatgttatca 4320
 ggcgagcaga cctgaacggc agcaacatgg agacagtgat cgggcgaggg ctgaagacca 4380
 ctgacgggct ggcaagtggac tgggtggcca ggaacctgta ctggacagac acaggtcgaa 4440
 ataccattga ggcgtccagg ctggatggtt cctgccgcaa agtactgac aacaatagcc 4500
 tggatgagcc ccgggccatt gctgttttcc ccaggaaggg gtacctcttc tggacagact 4560
 ggggccacat tgccaagatc gaacgggcaa acttggatgg ttctgagcgg aaggtcctca 4620
 tcaacacaga cctgggttgg cccaatggcc ttaccctgga ctatgatacc cgcaggatct 4680
 actgggtgga tgcgcctctg gaccggatcg agagtgtga cctcaatggg aaactgcggc 4740
 aggtcttggc cagccatgtg tcccaccctt ttgccctcac acagcaagac aggtggatct 4800
 actggacaga ctggcagacc aagtcaatcc agcgtgtga caaatactca ggccggaaca 4860
 aggagacagt gctggcaaat gtggaaggac tcatggatat catcgtggtt tcccctcagc 4920
 ggcagacagg gaccaatgcc tgttgtgtga acaatggtgg ctgcaccac ctctgctttg 4980
 ccagagcctc ggacttcgta tgtgcctgtc ctgacgaacc tgatagccgg ccctgctccc 5040
 ttgtgcctgg cctggtacca ccagctccta gggctactgg catgagtga aagagcccag 5100
 tgctacccaa cacaccacct accaccttgt attcttcaac caccggacc cgcacgtctc 5160
 tggaggaggt ggaaggaaga tgctctgaaa gggatgccag gctgggcctc tgtgcacgtt 5220
 ccaatgacgc tgttcctgct gctccagggg aaggacttca tatcagctac gccattggtg 5280
 gactcctcag tattctgctg attttggtgg tgattgcagc tttgatgctg tacagacaca 5340
 aaaaatccaa gttcactgat cctggaatgg ggaacctcac ctacagcaac ccctcctacc 5400
 gaacatccac acaggaagtg aagattgaag caatcccaa accagccatg tacaaccagc 5460
 tgtctataa gaaagaggga gggcctgacc ataactacac caaggagaag atcaagatcg 5520
 tagagggaat ctgcctcctg tctggggatg atgtgagtg ggatgacctc aagcaactgc 5580
 gaagctcacg ggggggcctc ctccgggatc atgtatgcat gaagacagac acggtgtcca 5640
 tccaggccag ctctggctcc ctggatgaca cagagacgga gcagctgtta caggaagagc 5700

agttctgagtg tagcagcgtc catactgcag ccactccaga aagacgaggc tctctgccag 5760

acacgggctg gaaacatgaa cgcaagctct cctcagagag ccaggtctaa 5810

<210> 3

<211> 1113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Gly Arg Val Ser Phe Ser Val Arg Val Ser Ser Val Arg Arg Ala
1 5 10 15

Arg Cys Ser Cys Pro Gly Arg Cys Tyr Leu Ser Cys Arg Val Pro Pro
20 25 30

Thr Thr Ala Leu Arg Ala Leu Asn Gly Leu Gly Cys Ala Gly Val Pro
35 40 45

Gly Glu Thr Ala Gly Gly Ala Val Gly Pro Gly Pro Leu Gly Thr Arg
50 55 60

Gly Phe Leu Ser Gly Ser Lys Phe Gln Ala Pro Gly Ser Trp Lys Asp
65 70 75 80

Cys Phe Gly Ala Pro Pro Ala Pro Asp Val Leu Arg Ala Asp Arg Ser
85 90 95

Val Gly Glu Gly Cys Pro Gln Lys Leu Val Thr Ala Asn Leu Leu Arg
100 105 110

Phe Leu Leu Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Ile Val Leu
115 120 125

Leu Ala Ile Leu Leu Ser Phe Val Gly Thr Leu Lys Arg Val Tyr Phe
130 135 140

Lys Ser Asn Asp Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ala Arg Val
 145 150 155 160

Pro Gly Val Ile Pro Val Asn Thr Val Tyr Tyr Glu Asn Thr Gly Ala
 165 170 175

Pro Ser Leu Pro Pro Ser Gln Ser Thr Pro Ala Trp Thr Pro Arg Ala
 180 185 190

Pro Ser Pro Glu Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Thr Cys Met Asn
 195 200 205

Ile Thr His Ser Gln Cys Gln Ile Leu Pro Tyr His Ser Thr Leu Ala
 210 215 220

Pro Leu Leu Pro Ile Val Lys Asn Met Asp Met Glu Lys Phe Leu Lys
 225 230 235 240

Phe Phe Thr Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Leu Leu
 245 250 255

Phe Gly Cys Ser Leu Ala Phe Pro Glu Cys Val Val Asp Gly Asp Asp
 260 265 270

Arg His Gly Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu
 275 280 285

Gly Cys Glu Ser Val Leu Gly Met Val Asn Ser Ser Trp Pro Asp Ser
 290 295 300

Leu Arg Cys Ser Gln Phe Arg Asp His Thr Glu Thr Asn Ser Ser Val
 305 310 315 320

Arg Lys Ser Cys Phe Ser Leu Gln Gln Glu His Gly Lys Gln Ser Leu
 325 330 335

Cys Gly Gly Gly Glu Ser Phe Leu Cys Thr Ser Gly Leu Cys Val Pro
 340 345 350

Lys Lys Leu Gln Cys Asn Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp
 355 360 365

Glu Ala His Cys Asn Cys Ser Lys Asp Leu Phe His Cys Gly Thr Gly
 370 375 380

Lys Cys Leu His Tyr Ser Leu Leu Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly
 385 390 395 400

Asp Pro Ser Asp Glu Gln Asn Cys Asp Cys Asn Leu Thr Lys Glu His
 405 410 415

Arg Cys Gly Asp Gly Arg Cys Ile Ala Ala Glu Trp Val Cys Asp Gly
 420 425 430

Asp His Asp Cys Val Asp Lys Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His
 435 440 445

Ser Gln Gly Leu Val Glu Cys Thr Ser Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr
 450 455 460

Phe Gln Cys Asp Gly Asp Glu Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu
 465 470 475 480

Asn Cys Ser Asp Ser Gln Thr Pro Cys Pro Glu Gly Glu Gln Gly Cys
 485 490 495

Phe Gly Ser Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Gly Ser Ser Leu Cys Asp
 500 505 510

Ser Asp Ser Ser Leu Ser Asn Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu
 515 520 525

Glu Leu Cys Met Asn Leu Leu Tyr Asn His Thr His Tyr Pro Asn Tyr
 530 535 540

Leu Gly His Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser
 545 550 555 560

Leu Phe Pro Ala Leu Val Gln Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe
 565 570 575

Phe Ala Cys Thr Ile Leu Val Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Gln
 580 585 590

Arg Ile Pro Pro Cys Arg Leu Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys
 595 600 605

Glu Ser Val Leu Gly Ile Val Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp
 610 615 620

Cys Asn Gln Phe Pro Glu Glu Ser Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Leu
 625 630 635 640

Pro Asn Glu Asp Val Glu Glu Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg
 645 650 655

Ser Gly Arg Cys Val Leu Gly Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp
 660 665 670

Cys Asp Asp Asp Ser Asp Glu Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Ala
 675 680 685

Leu Trp Glu Cys Pro Phe Asn Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Leu Ile
 690 695 700

Cys Asp Gly Phe Pro Asp Cys Pro Asp Ser Met Asp Glu Lys Asn Cys
 705 710 715 720

Ser Phe Cys Gln Asp Asn Glu Leu Glu Cys Ala Asn His Glu Cys Val
 725 730 735

Pro Arg Asp Leu Trp Cys Asp Gly Trp Val Asp Cys Ser Asp Ser Ser
 740 745 750

Asp Glu Trp Gly Cys Val Thr Leu Ser Lys Asn Gly Asn Ser Ser Ser
 755 760 765

Leu Leu Thr Val His Lys Ser Ala Lys Glu His His Val Cys Ala Asp
 770 775 780

Gly Trp Arg Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu
 785 790 795 800

Gly Glu Pro Ser Val Thr Lys Leu Ile Pro Gly Gln Glu Gly Gln Gln
 805 810 815

Trp Leu Arg Leu Tyr Pro Asn Trp Glu Asn Leu Asn Gly Ser Thr Leu
 820 825 830

Gln Glu Leu Leu Val Tyr Arg His Ser Cys Pro Ser Arg Ser Glu Ile
 835 840 845

Ser Leu Leu Cys Ser Lys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg
 850 855 860

Met Asn Lys Arg Ile Leu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp
 865 870 875 880

Pro Trp Gln Cys Ser Leu Gln Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly
 885 890 895

Cys Val Leu Ile Ala Lys Lys Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe
 900 905 910

Glu Gly Arg Glu Asp Ala Asp Val Trp Lys Val Val Phe Gly Ile Asn
 915 920 925

Asn Leu Asp His Pro Ser Gly Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr
 930 935 940

Ile Leu Leu His Pro Arg Tyr Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile
 945 950 955 960

Ser Val Val Glu Leu Ser Asp Asp Ile Asn Glu Thr Ser Tyr Val Arg
 965 970 975

Pro Val Cys Leu Pro Ser Pro Glu Glu Tyr Leu Glu Pro Asp Thr Tyr
 980 985 990

Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys
 995 1000 1005

Leu Gln Glu Gly Glu Val Arg Ile Ile Pro Leu Glu Gln Cys Gln
 1010 1015 1020

Ser Tyr Phe Asp Met Lys Thr Ile Thr Asn Arg Met Ile Cys Ala
 1025 1030 1035

Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Val Asp Ser Cys Met Gly Asp Ser Gly
 1040 1045 1050

Gly Pro Leu Val Cys Glu Arg Pro Gly Gly Gln Trp Thr Leu Phe
 1055 1060 1065

Gly Leu Thr Ser Trp Gly Ser Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly
 1070 1075 1080

Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val Ser Tyr Phe Val Gly Trp Ile Glu
 1085 1090 1095

Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe Leu Gln Lys Lys Ser Gln Gly
 1100 1105 1110

<210> 4
 <211> 1848
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Arg Gln Trp Gly Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Cys Ala
 1 5 10 15

His Val Leu Pro Thr Cys Ser Pro Leu Asp Phe His Cys Asp Asn Gly
 20 25 30

Lys Cys Ile Arg Arg Ser Trp Val Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Glu
 35 40 45

Asp Asp Ser Asp Glu Gln Asp Cys Pro Pro Arg Glu Cys Glu Glu Asp
 50 55 60

Glu Phe Pro Cys Gln Asn Gly Tyr Cys Ile Arg Ser Leu Trp His Cys
 65 70 75 80

Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Cys Asp Met
 85 90 95

Arg Lys Cys Ser Asp Lys Glu Phe Arg Cys Ser Asp Gly Ser Cys Ile
 100 105 110

Ala Glu His Trp Tyr Cys Asp Gly Asp Thr Asp Cys Lys Asp Gly Ser
 115 120 125

Asp Glu Glu Asn Cys Pro Ser Ala Val Pro Ala Pro Pro Cys Asn Leu
 130 135 140

Glu Glu Phe Gln Cys Ala Tyr Gly Arg Cys Ile Leu Asp Ile Tyr His
 145 150 155 160

Cys Asp Gly Asp Asp Asp Cys Gly Asp Trp Ser Asp Glu Ser Asp Cys
 165 170 175

Cys Glu Tyr Ser Gly Gln Leu Gly Ala Ser His Gln Pro Cys Arg Ser
 180 185 190

Gly Glu Phe Met Cys Asp Ser Gly Leu Cys Ile Asn Ala Gly Trp Arg
 195 200 205

Cys Asp Gly Asp Ala Asp Cys Asp Asp Gln Ser Asp Glu Arg Asn Cys
 210 215 220

Lys Gln Phe Arg Cys His Ser Gly Arg Cys Val Arg Leu Ser Trp Arg
 225 230 235 240

Cys Asp Gly Glu Asp Asp Cys Ala Asp Asn Ser Asp Glu Glu Asn Cys
 245 250 255

Glu Asn Thr Gly Ser Pro Gln Cys Ala Leu Asp Gln Phe Leu Cys Trp
 260 265 270

Asn Gly Arg Cys Ile Gly Gln Arg Lys Leu Cys Asn Gly Val Asn Asp
 275 280 285

Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Ser Pro Gln Gln Asn Cys Arg Pro Arg
 290 295 300

Thr Gly Glu Glu Asn Cys Asn Val Asn Asn Gly Gly Cys Ala Gln Lys
 305 310 315 320

Cys Gln Met Val Arg Gly Ala Val Gln Cys Thr Cys His Thr Gly Tyr
 325 330 335

Arg Leu Thr Glu Asp Gly His Thr Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala
 340 345 350

Glu Glu Gly Tyr Cys Ser Gln Gly Cys Thr Asn Ser Glu Gly Ala Phe
 355 360 365

Gln Cys Trp Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Arg Pro Asp Arg Arg Ser
 370 375 380

Cys Lys Ala Leu Gly Pro Glu Pro Val Leu Leu Phe Ala Asn Arg Ile
 385 390 395 400

Asp Ile Arg Gln Val Leu Pro His Arg Ser Glu Tyr Thr Leu Leu Leu
 405 410 415

Asn Asn Leu Glu Asn Ala Ile Ala Leu Asp Phe His His Arg Arg Glu
 420 425 430

Leu Val Phe Trp Ser Asp Val Thr Leu Asp Arg Ile Leu Arg Ala Asn
 435 440 445

Leu Asn Gly Ser Asn Val Glu Glu Val Val Ser Thr Gly Leu Glu Ser
 450 455 460

Pro Gly Gly Leu Ala Val Asp Trp Val His Asp Lys Leu Tyr Trp Thr
 465 470 475 480

Asp Ser Gly Thr Ser Arg Ile Glu Val Ala Asn Leu Asp Gly Ala His
 485 490 495

Arg Lys Val Leu Leu Trp Gln Asn Leu Glu Lys Pro Arg Ala Ile Ala
 500 505 510

Leu His Pro Met Glu Gly Thr Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Asn Thr
 515 520 525

Pro Arg Ile Glu Ala Ser Ser Met Asp Gly Ser Gly Arg Arg Ile Ile
 530 535 540

Ala Asp Thr His Leu Phe Trp Pro Asn Gly Leu Thr Ile Asp Tyr Ala
 545 550 555 560

Gly Arg Arg Met Tyr Trp Val Asp Ala Lys His His Val Ile Glu Arg
 565 570 575

Ala Asn Leu Asp Gly Ser His Arg Lys Ala Val Ile Ser Gln Val Phe
 580 585 590

Glu Asp Ser Leu Tyr Trp Thr Asp Trp His Thr Lys Ser Ile Asn Ser
 595 600 605

Ala Asn Lys Phe Thr Gly Lys Asn Gln Glu Ile Ile Arg Asn Lys Leu
 610 615 620

His Phe Pro Met Asp Ile His Thr Leu His Pro Gln Arg Gln Pro Ala
 625 630 635 640

Gly Lys Asn Arg Cys Gly Asp Asn Asn Gly Gly Cys Thr His Leu Cys
 645 650 655

Leu Pro Ser Gly Gln Asn Tyr Thr Cys Ala Cys Pro Thr Gly Phe Arg
 660 665 670

Lys Ile Ser Ser His Ala Cys Ala Gln Ser Leu Asp Lys Phe Leu Leu
 675 680 685

Phe Ala Arg Arg Met Asp Ile Arg Arg Ile Ser Phe Asp Thr Glu Asp
 690 695 700

Leu Ser Asp Asp Val Ile Pro Leu Ala Asp Val Arg Ser Ala Val Ala
 705 710 715 720

Leu Asp Trp Asp Ser Arg Asp Asp His Val Tyr Trp Thr Asp Val Ser
 725 730 735

Thr Asp Thr Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asp Gly Thr Gly Gln Glu Val
 740 745 750

Val Val Asp Thr Ser Leu Glu Ser Pro Ala Gly Leu Ala Ile Asp Trp
 755 760 765

Val Thr Asn Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ala Gly Thr Asp Arg Ile Glu
 770 775 780

Val Ala Asn Thr Asp Gly Ser Met Arg Thr Val Leu Ile Trp Glu Asn
 785 790 795 800

Leu Asp Arg Pro Arg Asp Ile Val Val Glu Pro Met Gly Gly Tyr Met
 805 810 815

Tyr Trp Thr Asp Trp Gly Ala Ser Pro Lys Ile Glu Arg Ala Gly Met
 820 825 830

Asp Ala Ser Gly Arg Gln Val Ile Ile Ser Ser Asn Leu Thr Trp Pro
 835 840 845

Asn Gly Leu Ala Ile Asp Tyr Gly Ser Gln Arg Leu Tyr Trp Ala Asp
 850 855 860

Ala Gly Met Lys Thr Ile Glu Phe Ala Gly Leu Asp Gly Ser Lys Arg
 865 870 875 880

Lys Val Leu Ile Gly Ser Gln Leu Pro His Pro Phe Gly Leu Thr Leu
 885 890 895

Tyr Gly Glu Arg Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Gln Thr Lys Ser Ile Gln
 900 905 910

Ser Ala Asp Arg Leu Thr Gly Leu Asp Arg Glu Thr Leu Gln Glu Asn
 915 920 925

Leu Glu Asn Leu Met Asp Ile His Val Phe His Arg Arg Arg Pro Pro
 930 935 940

Val Ser Thr Pro Cys Ala Met Glu Asn Gly Gly Cys Ser His Leu Cys
 945 950 955 960

Leu Arg Ser Pro Asn Pro Ser Gly Phe Ser Cys Thr Cys Pro Thr Gly
 965 970 975

Ile Asn Leu Leu Ser Asp Gly Lys Thr Cys Ser Pro Gly Met Asn Ser
 980 985 990

Phe Leu Ile Phe Ala Arg Arg Ile Asp Ile Arg Met Val Ser Leu Asp
 995 1000 1005

Ile Pro Tyr Phe Ala Asp Val Val Val Pro Ile Asn Ile Thr Met
 1010 1015 1020

Lys Asn Thr Ile Ala Ile Gly Val Asp Pro Gln Glu Gly Lys Val
 1025 1030 1035

Tyr Trp Ser Asp Ser Thr Leu His Arg Ile Ser Arg Ala Asn Leu
 1040 1045 1050

Asp Gly Ser Gln His Glu Asp Ile Ile Thr Thr Gly Leu Gln Thr
 1055 1060 1065

Thr Asp Gly Leu Ala Val Asp Ala Ile Gly Arg Lys Val Tyr Trp
 1070 1075 1080

Thr Asp Thr Gly Thr Asn Arg Ile Glu Val Gly Asn Leu Asp Gly
 1085 1090 1095

Ser Met Arg Lys Val Leu Val Trp Gln Asn Leu Asp Ser Pro Arg
 1100 1105 1110

Ala Ile Val Leu Tyr His Glu Met Gly Phe Met Tyr Trp Thr Asp
 1115 1120 1125

Trp Gly Glu Asn Ala Lys Leu Glu Arg Ser Gly Met Asp Gly Ser
 1130 1135 1140

Asp Arg Ala Val Leu Ile Asn Asn Asn Leu Gly Trp Pro Asn Gly
 1145 1150 1155

Leu Thr Val Asp Lys Ala Ser Ser Gln Leu Leu Trp Ala Asp Ala
 1160 1165 1170

His Thr Glu Arg Ile Glu Ala Ala Asp Leu Asn Gly Ala Asn Arg
 1175 1180 1185

His Thr Leu Val Ser Pro Val Gln His Pro Tyr Gly Leu Thr Leu
 1190 1195 1200

Leu Asp Ser Tyr Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Gln Thr Arg Ser Ile
 1205 1210 1215

His Arg Ala Asp Lys Gly Thr Gly Ser Asn Val Ile Leu Val Arg
 1220 1225 1230

Ser Asn Leu Pro Gly Leu Met Asp Met Gln Ala Val Asp Arg Ala
 1235 1240 1245

Gln Pro Leu Gly Phe Asn Lys Cys Gly Ser Arg Asn Gly Gly Cys
 1250 1255 1260

Ser His Leu Cys Leu Pro Arg Pro Ser Gly Phe Ser Cys Ala Cys
 1265 1270 1275

Pro Thr	Gly Ile Gln Leu Lys	Gly Asp Gly Lys Thr	Cys Asp Pro
1280	1285	1290	
Ser Pro	Glu Thr Tyr Leu Leu	Phe Ser Ser Arg Gly	Ser Ile Arg
1295	1300	1305	
Arg Ile	Ser Leu Asp Thr Ser	Asp His Thr Asp Val	His Val Pro
1310	1315	1320	
Val Pro	Glu Leu Asn Asn Val	Ile Ser Leu Asp Tyr	Asp Ser Val
1325	1330	1335	
Asp Gly	Lys Val Tyr Tyr Thr	Asp Val Phe Leu Asp	Val Ile Arg
1340	1345	1350	
Arg Ala	Asp Leu Asn Gly Ser	Asn Met Glu Thr Val	Ile Gly Arg
1355	1360	1365	
Gly Leu	Lys Thr Thr Asp Gly	Leu Ala Val Asp Trp	Val Ala Arg
1370	1375	1380	
Asn Leu	Tyr Trp Thr Asp Thr	Gly Arg Asn Thr Ile	Glu Ala Ser
1385	1390	1395	
Arg Leu	Asp Gly Ser Cys Arg	Lys Val Leu Ile Asn	Asn Ser Leu
1400	1405	1410	
Asp Glu	Pro Arg Ala Ile Ala	Val Phe Pro Arg Lys	Gly Tyr Leu
1415	1420	1425	
Phe Trp	Thr Asp Trp Gly His	Ile Ala Lys Ile Glu	Arg Ala Asn
1430	1435	1440	
Leu Asp	Gly Ser Glu Arg Lys	Val Leu Ile Asn Thr	Asp Leu Gly
1445	1450	1455	

Trp Pro Asn Gly Leu Thr Leu Asp Tyr Asp Thr Arg Arg Ile Tyr
 1460 1465 1470

Trp Val Asp Ala His Leu Asp Arg Ile Glu Ser Ala Asp Leu Asn
 1475 1480 1485

Gly Lys Leu Arg Gln Val Leu Val Ser His Val Ser His Pro Phe
 1490 1495 1500

Ala Leu Thr Gln Gln Asp Arg Trp Ile Tyr Trp Thr Asp Trp Gln
 1505 1510 1515

Thr Lys Ser Ile Gln Arg Val Asp Lys Tyr Ser Gly Arg Asn Lys
 1520 1525 1530

Glu Thr Val Leu Ala Asn Val Glu Gly Leu Met Asp Ile Ile Val
 1535 1540 1545

Val Ser Pro Gln Arg Gln Thr Gly Thr Asn Ala Cys Gly Val Asn
 1550 1555 1560

Asn Gly Gly Cys Thr His Leu Cys Phe Ala Arg Ala Ser Asp Phe
 1565 1570 1575

Val Cys Ala Cys Pro Asp Glu Pro Asp Ser Arg Pro Cys Ser Leu
 1580 1585 1590

Val Pro Gly Leu Val Pro Pro Ala Pro Arg Ala Thr Gly Met Ser
 1595 1600 1605

Glu Lys Ser Pro Val Leu Pro Asn Thr Pro Pro Thr Thr Leu Tyr
 1610 1615 1620

Ser Ser Thr Thr Arg Thr Arg Thr Ser Leu Glu Glu Val Glu Gly
 1625 1630 1635

Arg Cys Ser Glu Arg Asp Ala Arg Leu Gly Leu Cys Ala Arg Ser
 1640 1645 1650

Asn Asp Ala Val Pro Ala Ala Pro Gly Glu Gly Leu His Ile Ser
 1655 1660 1665

Tyr Ala Ile Gly Gly Leu Leu Ser Ile Leu Leu Ile Leu Val Val
 1670 1675 1680

Ile Ala Ala Leu Met Leu Tyr Arg His Lys Lys Ser Lys Phe Thr
 1685 1690 1695

Asp Pro Gly Met Gly Asn Leu Thr Tyr Ser Asn Pro Ser Tyr Arg
 1700 1705 1710

Thr Ser Thr Gln Glu Val Lys Ile Glu Ala Ile Pro Lys Pro Ala
 1715 1720 1725

Met Tyr Asn Gln Leu Cys Tyr Lys Lys Glu Gly Gly Pro Asp His
 1730 1735 1740

Asn Tyr Thr Lys Glu Lys Ile Lys Ile Val Glu Gly Ile Cys Leu
 1745 1750 1755

Leu Ser Gly Asp Asp Ala Glu Trp Asp Asp Leu Lys Gln Leu Arg
 1760 1765 1770

Ser Ser Arg Gly Gly Leu Leu Arg Asp His Val Cys Met Lys Thr
 1775 1780 1785

Asp Thr Val Ser Ile Gln Ala Ser Ser Gly Ser Leu Asp Asp Thr
 1790 1795 1800

Glu Thr Glu Gln Leu Leu Gln Glu Glu Gln Ser Glu Cys Ser Ser
 1805 1810 1815

Val His Thr Ala Ala Thr Pro Glu Arg Arg Gly Ser Leu Pro Asp
 1820 1825 1830

Thr Gly Trp Lys His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Glu Ser Gln Val
 1835 1840 1845

<210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 5
 cagctccaca acctacatca ttccgt 26

<210> 6
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 6
 acggaatgat gt 12

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 7
 gtccatcttc tctctgagac tctggt 26

<210> 8
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 8

accagagtct ca

12

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 9

ctgatgggtg tcttctgtga gtgtgt

26

<210> 10

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 10

acacactcac ag

12

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 11

ccagcatcga gaatcagtgt gacagt

26

<210> 12

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 12

actgtcacac tg

12

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 13

gtcgatgaac ttcgactgtc gatcgt

26

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized adaptor sequence

<400> 14

acgatcgaca gt

12

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 15

tagctacca ctgctcgact gtaacg

26

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 16

cagagtgaac ccagtggaca tatctg

26

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 17

gttccaagg aaagtgtcag agttgg

26

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 18

gaagctggaa agcctccagg tgttcc

26

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 19

ctccgagcag acaccatgac cttagc

26

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 20

aggagtaggg cttgtctccc aacctg

26

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 21

cactcctgtg tctagctgcc agatgc

26

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 22

agtgccaaca cagtagtgct gacagg

26

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 23

gatgaagaag aaggagcaga gtcagg

26

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 24

attcacttgc tctgactcca ggttgg

26

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 25

ccatgatctt tcccctctgg cttctg

26

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 26

tttgctgga aagggtgact ctgagg

26

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 27

tgctctcacc atccagatga ctcacc

26

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 28

tggaccatat ctgctgcaac tgggcc

26

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 29

tccagcagat gcaagaactc tcctcc

26

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 30

ttatggagcg gaggcagcatt ccaagg

26

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox